BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 10 Campinas, Outubro de 1950 N.º 10

SUMÁRIO

Pág.

PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DE MANDIOCA. — Utilização de bolores na sacarificação do amido 277
C. G. Teixeira

PROCESSO CONTÍNUO PARA FERMENTAÇÕES INDUSTRIAIS 287
Paul Kolachov, Le Roy A. Smith e H. Frederick Willkie

MOSAICO DA CITRONELA 301
A. S. Costa, A. R. Lima e A. Jacob

ANÁLISE DE UM EXPERIMENTO PARA COMBATE DE VIRA-CABEÇA DO TOMATEIRO 305
C. G. Fraga Jr. e A. S. Costa

NOTA

Rachadura dos tubérculos de batatinha 317
O. J. Boock e A. S. Costa

Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo
Departamento da Produção Vegetal
CAIXA POSTAL 28 — CAMPINAS
Estado de São Paulo — Brasil

DEPARTAMENTO DA PRODUÇÃO VEGETAL

DIRETOR GERAL, SUBSTITUTO: M. D. Homem de Melo

Divisão de Experimentação e Pesquisas

INSTITUTO AGRONÔMICO

DIRETOR: — C. A. Krug

SUBDIVISÕES

SUBDIVISÃO DE GENÉTICA : — A. Carvalho (substituto).

Secção de Genética : — A. Carvalho A. S. Costa, E. B. Germeck, H. Antunes Filho, M. J. Purchio, M. P. Penteado, C. Marozzi

Secção de Citologia : — A. J. T. Mendes, C. H. T. Mendes, Dixier M. Medina.

Secção de Introdução de Plantas Cultivadas : — L. A. Nucci (substituto).

SUBDIVISÃO DE HORTICULTURA : — S. Moreira.

Secção de Citricultura e Plantas Tropicais : — S. Moreira, J. Ferreira da Cunha, O. Galli, J. Soubihe Sobrinho.

Secção de Olericultura e Floricultura : — O. de Toledo Prado, S. Alves, L. de Sousa Camargo.

Secção de Viticultura e Frutas de Clima Temperado : J. R. A. Santos Neto, E. P. Guião, P. V. C. Bittencourt, O. Rigitano, O. Zardeto de Toledo, J. B. Bernardi.

SUBDIVISÃO DE PLANTAS TÊXTEIS : — I. Ramos, O. S. Neves (substituto).

Secção de Algodão : — I. Ramos, O. S. Neves (substituto), V. Schmidt, H. de Castro Aguiar, E. S. Martinelli, P. A. Cavaleri.

Secção de Plantas Fibrosas Diversas : — J. Vizioli, J. C. Medina, F. A. Correia, G. de Paiva Castro.

SUBDIVISÃO DE ESTAÇÕES EXPERIMENTAIS : — C. A. Krug, assistido por S Moreira e C. S. Novais Antunes.

BRAGANTIA

Redação Técnica : A. Carvalho e A. Pais de Camargo.
Redação : B. Cavalcante Pinto e Ciro Alves Mourão.

Assinatura anual, Cr$ 50,00. — Para engenheiros agrônomos, 50% de abatimento.

Tôda correspondência deve ser dirigida à Redação de BRAGANTIA — Caixa postal 28. CAMPINAS — Est. de São Paulo — BRASIL.

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRONÔMICO

Vol. 10 Campinas, Outubro de 1950 N.º 10

PRODUÇÃO DE ÁLCOOL DE MANDIOCA

UTILIZAÇÃO DE BOLORES NA SACARIFICAÇÃO DO AMIDO

C. G. TEIXEIRA

Engenheiro agrônomo, Secção de Fitopatologia, Instituto Agronômico de Campinas

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas segregadas por bolores na sacarificação de substâncias amiláceas é conhecida no Oriente desde os tempos imemoriais. Nessa região, a matéria-prima mais empregada para a produção de álcool etílico é o arroz. A conversão do amido em açúcares fermentáveis é realizada pelo emprêgo de culturas de bolores que possuem as enzimas sacarificantes. Estas culturas utilizadas na sacarificação do arroz recebem, no Japão, o nome de "koji" e, no Sião, de "ragi". Jalavicharana (3) estudou a microflora do "ragi" e verificou a presença de espécies de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, etc. Predominou, entretanto, o *Aspergillus flavus* Link. No "koji", preparado no Japão, há predominância do *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn.

Êste processo de sacarificação utilizado nos países asiáticos é ainda bem primitivo e redunda em baixo rendimento alcoólico, devido a uma sacarificação imperfeita, e o produto obtido não é muito uniforme.

Métodos modernos para a utilização de bolores como agentes sacarificantes das substâncias amiláceas estão sendo desenvolvidos nestes últimos anos. A utilização de bolores selecionados, com alto poder enzimático, e o aperfeiçoamento de processos industriais para multiplicá-los, redundariam certamente em alto rendimento alcoólico, em virtude de uma sacarificação bastante eficiente.

Nos Estados Unidos, em 1914, Takamine (8) publicou resultados de experiências realizadas em escala industrial e nas quais utilizou culturas de *Aspergillus oryzae* como agente sacarificante. O rendimento alcoólico obtido foi igual ao de mostos sacarificados com malte de cevada.

Os bolores têm sido usados em escala industrial para sacarificação do amido sob a forma de farelo embolorado (*mold bran*) ou pelo processo amilo. O farelo embolorado é obtido pelo crescimento do bolor selecionado em farelo de cereal umedecido e passado pela autoclave, que é conservado em salas onde a temperatura, umidade do ar e arejamento são controlados cuidadosamente. Após um período de crescimento de 30-40 horas, o farelo

embolorado é removido desta sala incubadora e pôsto a secar. Êste produto, depois de sêco, vai substituir o malte na destilaria. No processo amilo, estirpes selecionadas de *Rhizopus* ou *Mucor* são cultivadas em goma de amido pré-liquidificada, cozida e arejada. Dentro de 24-28 horas, quantidade suficiente de enzimas é segregada para sacarificar o amido existente na goma.

Ambos os processos apresentam certas desvantagens. O preparo do farelo embolorado é um processo trabalhoso, ocupa muito espaço e exige equipamento especial. Além disso, é necessário empregar um farelo de cereal como substrato. No processo amilo, todo o mosto deve ser prèviamente liquidificado e depois arejado durante o crescimento do fungo, o que encarece e dificulta a operação.

Le Mense (4) e outros estudaram a viabilidade de se obterem enzimas sacarificantes segregadas por bolores, que são multiplicados em culturas submersas e suficientemente arejadas. Várias espécies de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Monilia* foram cultivadas e submetidas a teste, quanto ao poder enzimático. Entre elas, destacou-se uma estirpe de *Aspergillus niger* van Tieghem, da coleção do Northern Regional Research Laboratory, Illinois, EE. UU., sob o número 337. O próprio Le Mense (5), em colaboração com outros pesquisadores, publicou um trabalho dando detalhes e o preço de custo de uma instalação para produzir cultura submersa de fungos utilizados como agentes sacarificantes do amido.

No norte do Brasil, os pequenos agricultores produzem ainda uma espécie de aguardente de mandioca, por um processo bastante primitivo, em que a sacarificação do amido é feita por meio de fungos. A aguardente resultante recebe o nome de tiquira (6).

Banzon e outros (2) realizaram experiências utilizando farelo embolorado na sacarificação do amido de mandioca. Observaram que o farelo embolorado é um agente mais ativo que o malte de cevada na sacarificação dêsse amido. Um rendimento teórico, de cêrca de 70%, foi obtido pela sacarificação da mandioca com 8-10% de malte de cevada. Pela utilização de 10% de farelo embolorado, na sacarificação do amido de mandioca, foi obtido um rendimento teórico entre 80-85%.

Em vista do preço elevado do malte de cevada, tem-se usado em nosso meio o malte de milho. Êste malte é produzido na própria destilaria. É uma operação demorada e que exige muito cuidado, a fim de evitar contaminação por meio de bactérias e bolores existentes no ar.

A utilização de culturas submersas na sacarificação de substâncias amiláceas, para produção de álcool, resultaria numa simplificação do processo e seria a mais adequada para o nosso país, onde a temperatura elevada e a umidade do ar são agentes desfavoráveis para a produção de um bom malte.

As experiências realizadas tiveram como objetivo verificar a viabilidade da utilização, em escala industrial, de cultura submersa de fungos na sacarificação do amido de mandioca. Os resultados experimentais foram bastante satisfatórios. Obtiveram-se rendimentos alcoólicos superiores aos que são atualmente conseguidos em nosso país. Além disso, o processo é o que parece mais adequado para as regiões de clima quente e úmido.

2 - CULTURA SUBMERSA DE BOLOR

O mais sério empecilho para o desenvolvimento da indústria de álcool de substâncias amiláceas em nosso meio é a escassez de malte e a dificuldade de obtê-lo e preservá-lo. Sòmente as cervejarias usam malte de cevada e a maior parte dêste malte é importada. Em virtude do elevado preço do malte de cevada (cêrca de Cr$ 4,00 o quilo), a sua utilização nas destilarias torna-se impraticável, por causar a elevação do custo de produção do álcool obtido. O problema se resume em achar um substituto para o malte, que redunde em rendimentos alcoólicos iguais ou superiores aos obtidos de mostos sacarificados com malte.

2.1 - VANTAGEM DA CULTURA SUBMERSA

Várias são as vantagens oferecidas pela utilização de culturas submersas na sacarificação do amido. Entre elas, podem-se citar as seguintes : *a*) o custo da operação de sacarificação é menor que o da sacarificação com o malte ; *b*) elimina-se uma das operações mais difíceis na destilaria, que é a de produção de malte ; *c*) a operação de fermentação pode ser realizada assèpticamente, o que não é possível quando se usa malte na sacarificação ; *d*) a sacarificação é mais eficiente que pelo uso de malte de cevada ; *e*) substratos simples e de baixo preço podem ser utilizados como meio de cultura para a multiplicação do fungo ; *f*) o rendimento alcoólico obtido é igual, ou superior, ao de mostos sacarificados com malte ; *g*) não é necessária nenhuma modificação na aparelhagem utilizada para a produção de álcool de substâncias amiláceas, pelo processo clássico da maltagem.

2.2 - PREPARO DA CULTURA SUBMERSA

Em experiências realizadas pelo autor (**9**), obtiveram-se ótimos resultados na multiplicação de *Aspergillus niger* estirpe NRRL-337, utilizando o seguinte substrato :

Farelo de vinhaça desidratada (1)	5,0%
Milho moído	1,0%
Carbonato de cálcio	0,5%

Coloca-se uma certa quantidade de água corrente em um recipiente de vidro onde vai ser preparado o meio de cultura e adiciona-se, a seguir, o farelo de vinhaça. Ferve-se em uma outra vasilha uma quantidade de água suficiente para produzir uma goma de milho de viscosidade média. O milho moído é misturado com uma pequena porção de água fria. Quando a água da vasilha estiver em ebulição, junta-se o milho moído vagarosamente, com agitação constante. Após dez minutos de cozimento, a goma de milho é transferida para o vidro onde vai ser preparado o meio de cultura. Junta-se, a seguir, carbonato de cálcio. Completa-se o volume com água corrente. O vidro é tamponado com algodão e esterilizado em autoclave a 125°C, durante três horas.

(1) Tradução da expressão inglêsa *distillers'dried solubles*.

Os mostos de raspa de mandioca sacarificados com culturas de fungo, obtidas neste substrato, apresentaram um alto rendimento alcoólico (quadro 1).

O meio de cultura na base de vinhaça desidratada é ótimo para a multiplicação do *Aspergillus niger*. Nos Estados Unidos, onde o farelo de vinhaça

QUADRO 1.—Resultados de fermentação de mostos de raspa da mandioca, sacarificados com malte, de cevada e de milho, e com culturas submersas de *Aspergillus niger*, propagadas em diferentes substratos

Processos de sacarificação		Concentração do mosto		Rendimento alcoólico		Aproveitamento industrial (rendimento teórico)
Agente	Percentagem usada (1)	Raspa	Amido	Leitura no refratômetro	Álcool obtido de 1 000 kg de raspa	
		%	%	%	*litros*	%
SACARIFICAÇÃO COM MALTE						
Malte de cevada *	7	17,6	13,2	6,8	416,6	74,1
Malte de milho **	10	------	------	------	316,0	------
	13,8	------	------	------	410,0	------
	16,0	------	------	------	450,0	------
SACARIFICAÇÃO COM FUNGO (2)						
A. niger (substratos)						
Farelo de vinhaça	10	17,6	13,6	8,6	485,6	90,5
Torta de algodão	10	15,3	10,5	7,2	472,4	95,5
Farinha de soja integral	10	15,3	10,5	7,2	472,4	95,5

Fonte: * = dados obtidos pelo autor (9). ** = dados obtidos por Almeida (1)

(1) Para o malte, percentagem gravimétrica e, para o fungo, volumétrica

(2) Os dados referentes aos substratos preparados com torta de algodão e soja integral representam a média de 12 fermentadores

pode ser adquirido com facilidade e a preço razoável, a utilização dêste meio de cultura é ideal.

Em virtude da dificuldade, entre nós, de obtenção de farelo de vinhaça, procurou-se encontrar um outro meio de cultura que o pudesse substituir, onde o fungo se desenvolvesse bem e apresentasse um alto poder sacarificante. A condição essencial seria a utilização de substâncias de fácil aquisição no comércio e de baixo preço, condição primordial para que o processo pudesse ser de valor econômico. Êsse substrato deveria ser rico em nitrogênio fàcilmente assimilável e em complexo vitamínico B.

Entre os diversos substratos experimentados, dois foram bastante satisfatórios, e têm a seguinte composição em relação ao pêso em água:

SUBSTRATO 1

Torta de algodão peneirada	3,0%
Raspa de mandioca	2,0%
Farelo de arroz	0,5%

SUBSTRATO 2

Farinha de soja integral	3,0%
Arroz integral moído	2,0%

Essas culturas são preparadas em vasilhames de vidro com capacidade para 20 litros, nos quais são colocados 12 litros de meio de cultura. O

processo de preparação dos meios de culturas constituídos pelos substratos 1 e 2 é idêntico ao já descrito para o farelo de vinhaça desidratada. O arroz ou a raspa de mandioca devem ser cozidos separadamente. Não foi adicionado aos meios de culturas o carbonato de cálcio. Os vidros contendo o meio de cultura são esterilizados e, a seguir, resfriados. Os vidros são semeados com 50 cc de cultura submersa de *Aspergillus niger* estirpe NRRL-337. Esta cultura é obtida semeando-se um frasco Erlenmeyer contendo os 50 cc de meio de cultura esterilizado com esporos obtidos de tubo com cultura pura do fungo. O frasco Erlenmeyer, após semeadura, é arejado durante 48 horas por meio de agitação (fig. 1).

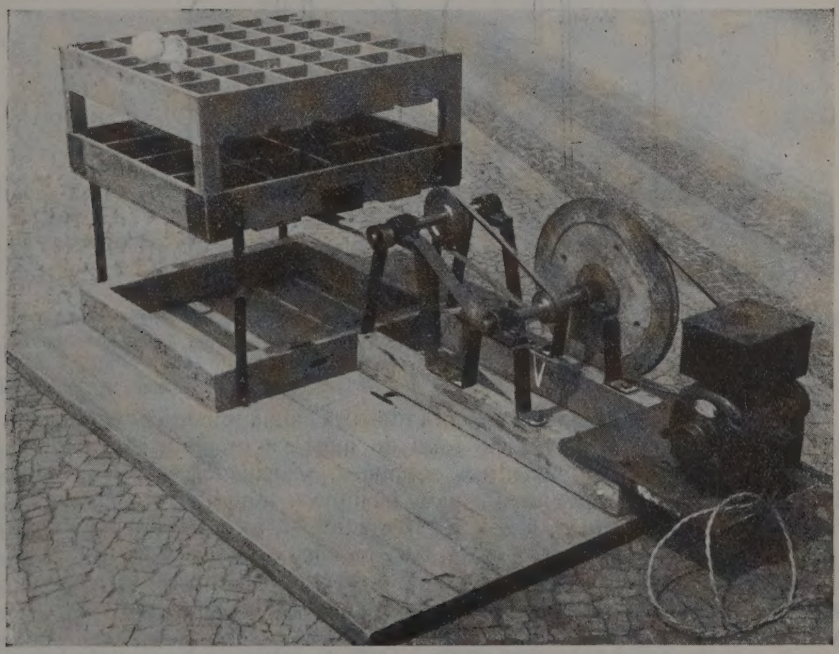


Figura 1.—Agitador para arejamento de culturas submersas de fungos.

Esta cultura, que foi arejada durante 48 horas, vai servir para semear o substrato do vasilhame de 20 litros. O arejamento da cultura nos recipientes de vidro se faz pela introdução de ar esterilizado e úmido, como mostra a figura 2.

O fungo é multiplicado nos recipientes de vidro à temperatura ambiente (25-30°C) durante 72 horas. Decorrido êsse período de arejamento, a cultura se apresenta bastante desenvolvida e com alto poder sacarificante. Conserva-se, a seguir, em geladeira, para ser utilizada posteriormente nas experiências de sacarificação da raspa de mandioca.

3 - PREPARO DO MOSTO

O mosto de raspa de mandioca, sacarificado com cultura submersa de *Aspergillus niger*, é preparado de acôrdo com a técnica preconizada por Stark e outros (7), como segue :

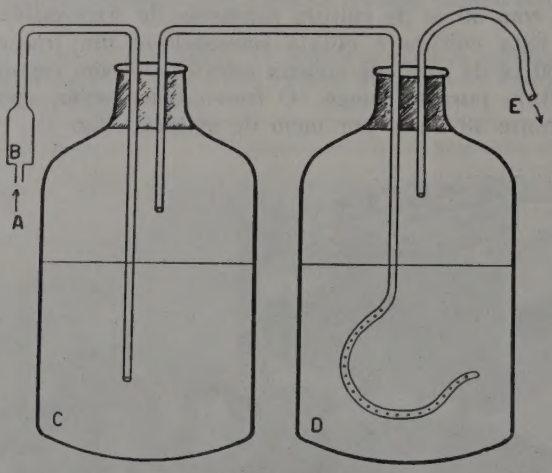


FIGURA 2.—Recipientes de vidro para multiplicação de fungos em cultura submersa. *A* — ar comprimido; *B* — filtro de algodão; *C* — vidro com água esterilizada; *D* — cultura submersa do fungo; *E* — tubo para escape do ar.

a) aquece-se a uma temperatura de 48°C uma quantidade de água igual a cêrca de 3/5 do volume total do mosto a preparar ;

b) juntam-se 2,5% da cultura submersa, calculados sôbre o volume total do mosto a ser preparado, para facilitar a liquidificação da goma ;

c) eleva-se a temperatura a 54°C e junta-se a raspa de mandioca ;

d) ajusta-se o pH entre 5,4 e 5,6 com ácido sulfúrico N/1 ;

e) a goma, constantemente agitada, é mantida à temperatura de ebulição do banho-maria durante uma hora e, em seguida, posta em autoclave a 125°C, durante uma hora ;

f) a goma é resfriada a 60-63°C, e 10% de cultura submersa do bolor, calculados sôbre o volume total de mosto a preparar, são adicionados para a sacarificação do amido ; conserva-se a esta temperatura durante dez minutos, e, a seguir, resfria-se a 30°C ;

g) ajusta-se o pH a mais ou menos 4,6—4,8 com ácido sulfúrico N/1 e completa-se o volume com água corrente esterilizada, de modo que se obtenha um mosto final com a concentração desejada ; os mostos obtidos de cada cozimento são fermentados em três frascos (fig. 3) e semeados com 2% de pé de fermentação de cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, estirpe 1-Y.

Os mostos preparados são fermentados durante cêrca de 65 horas a uma temperatura constante de 30°C. Em seguida, determina-se o teor alcoólico dos diferentes mostos preparados e calcula-se o rendimento.

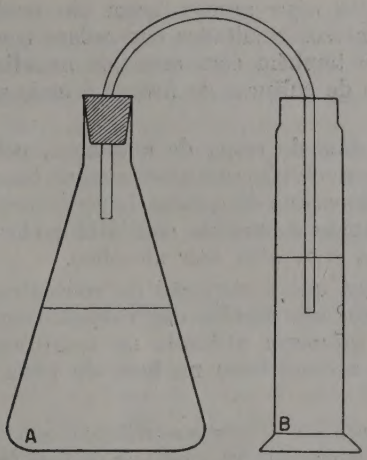


FIGURA 3.—Fermentador para testes em laboratório. *A* — frasco contendo o mosto a ser fermentado; *B* — proveta com água para borbulhamento dos gases resultantes da fermentação.

4 - ANÁLISE DOS MOSTOS FERMENTADOS

Os mostos fermentados são analisados a fim de se determinar o teor alcoólico, acidez e Brix.

Transferem-se 100 cc do mosto fermentado, medidos em frasco volumétrico, para um frasco Kjeldhal. Lava-se duas vêzes o frasco volumétrico com água destilada, e essa água de lavagem é adicionada ao mosto existente no frasco Kjeldhal. Destila-se o mosto e recebe-se o destilado em um frasco volumétrico de 100 cc. Recolhem-se no frasco volumétrico aproximadamente 97-98 cc de destilado. Completa-se o volume com água destilada. O teor alcoólico do destilado é determinado por meio do refratômetro de imersão a uma temperatura de 25°C. As leituras devem ser feitas quando a temperatura do destilado fôr exatamente 25°C, para evitar erros. Determinado o teor alcoólico do destilado, calcula-se o rendimento. O mosto fermentado, que não foi destilado, é filtrado e determina-se a acidez e o Brix do filtrado.

O quadro 1 apresenta os dados comparativos, em relação ao rendimento alcoólico, quando se utiliza malte de cevada, malte de milho e cultura submersa de fungo na sacarificação da raspa de mandioca. Os dados referentes ao rendimento alcoólico utilizando cultura submersa de fungo e malte de cevada são referentes às experiências realizadas pelo autor nos Estados Unidos (**9**). Os dados relativos à sacarificação do amido de mandioca com malte de milho foram obtidos do trabalho de Almeida (**1**). Enquanto se obteve, para mostos sacarificados com malte de cevada, um rendimento alcoólico de 74% do teórico, os mostos sacarificados com cultura

submersa de *Aspergillus niger* apresentaram um rendimento alcoólico de 91% do teórico. Os nossos resultados concordam com os de Banzon (2), que, tendo trabalhado também com raspa de mandioca, observou que a sacarificação por meio de culturas de fungos é mais eficiente do que pelo malte de cevada.

Preparamos mostos de raspa de mandioca, pela sacarificação com culturas submersas desenvolvidas nos substratos na base de torta de algodão e de soja integral. Pelo exame do quadro 1, verifica-se que ambos os substratos ofereceram culturas submersas com alto poder sacarificante e que resultaram em mostos com alto teor alcoólico.

O quadro 2 mostra que a variação da concentração do mosto entre 15 e 17% pràticamente não resulta em variação alguma no rendimento alcoólico. A cultura submersa utilizada na sacarificação foi obtida pela propagação do fungo no substrato na base de torta de algodão.

QUADRO 2.—Resultados analíticos de mostos sacarificados com dez por cento de culturas submersas de fungos e propagadas em substratos na base de torta de algodão

Concentração dos mostos em percentagem		Numeração dos cozimentos	Índice de acidez do mosto		Brix		Rendimento alcoólico		Aproveitamento industrial (rendimento teórico)
Raspa	Amido		No início da fermentação	No final da fermentação	No início da fermentação	No final da fermentação	Leitura no refratômetro (1)	Álcool obtido de 1.000 kg de raspa	
			pH	*pH*			%	*litro*	%
CULTURAS SUBMERSAS DE *Aspergillus niger*									
15,2	10,1	1	------	4,10	11,3	— 0,6	7,03	461,3	96,7
		2	5,05	4,15	13,1	— 0,7	7,75	460,5	96,8
		3	5,00	4,15	13,3	— 0,6	7,82	464,7	97,7
16,8	11,2	4	4,90	4,10	13,3	— 0,8	7,84	465,8	97,9
		5	4,85	4,05	13,3	— 0,3	7,83	465,2	97,8
		6	4,85	4,10	13,1	— 0,5	7,84	465,8	97,9
		7	4,90	4,10	13,2	— 0,7	7,72	458,7	96,6
		8	4,85	4,10	13,6	— 0,7	8,08	457,8	95,9
17,6	11,7	9	4,85	4,10	13,4	— 0,7	8,18	463,5	97,1
CULTURAS SUBMERSAS DE *Aspergillus oryzae*									
15,2	10,1	10	5,20	4,25	11,9	+ 0,9	6,17	404,9	84,8
		11	5,00	4,25	12,1	+ 0,9	6,85	407,0	85,2
16,8	11,2	12	4,95	4,20	12,6	+ 1,1	6,57	390,4	82,2
		13	4,65	4,15	12,4	+ 1,1	6,57	390,4	82,2
		14	4,90	4,20	13,0	+ 1,1	6,63	393,9	82,8

(1) Médias de três fermentadores

Experiências foram feitas para determinar o poder sacarificante de alguns bolores existentes na coleção do Instituto Agronômico. Uma estirpe de *Aspergillus oryzae*, isolada originalmente de dorna de fermentação de saqué (vinho de arroz), Fazenda Monte Deste, município de Campinas, foi a que apresentou maior atividade enzimática. Êste fungo foi multiplicado durante 48 horas no substrato na base de torta de algodão. Após 48 horas, a cultura tornou-se bastante densa e não foi possível propagar o

fungo por um período de 72 horas. Mostos de raspa de mandioca foram obtidos pela sacarificação com cultura submersa dêste fungo, e os resultados estão registados na parte inferior do quadro 2.

Pelo exame do quadro 2, observa-se que as culturas submersas de *Aspergillus niger* possuem um poder sacarificante mais elevado que as culturas de *Aspergillus oryzae*, o que é evidenciado pela análise do rendimento alcoólico obtido de mostos sacarificados pelos dois fungos. A cultura de *Aspergillus niger* parece ser a mais adaptada para cultivo em cultura submersa, desenvolvendo uma atividade enzimática bastante elevada e produzindo ótima sacarificação do amido.

5 - VALOR NUTRITIVO DA VINHAÇA

O mosto fermentado, sacarificado com cultura submersa de *Aspergillus niger*, propagado no meio, na base de torta de algodão, foi filtrado e o resíduo retido no filtro foi sêco a 80°C. O resíduo sêco foi analisado pelo Dr. Manuel Becker, Departamento da Produção Animal da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, tendo revelado a seguinte composição :

Composição	
Umidade (110°C)	6,99%
Proteína	25,20%
Matéria mineral	8,73%
Matéria graxa	6,89%
Fibras	12,24%
E. N. Az.	39,95%

Pela análise do resíduo, verificou-se que apresenta um teor elevado de proteína e que poderá ser de grande valor na alimentação de gado e aves. A utilização dêste subproduto da destilaria poderá resultar em uma redução do custo do álcool obtido. Sendo de alto valor nutritivo, a sua utilização contribuirá para melhorar o valor alimentício das rações do gado e das aves. Nos Estados Unidos, o subproduto de destilaria é consumido em grande escala para a alimentação dêsses animais. A importância dêste subproduto tem aumentado de tal modo que a tendência é a de se tornar o principal produto da destilaria, constituindo o álcool um subproduto. Em nosso meio, onde a alimentação para o gado é deficiente em proteínas, seria de grande interêsse investigar a viabilidade da utilização dêsse subproduto da destilaria na alimentação dos rebanhos.

SUMMARY

It has been shown that cassava starch can be converted into alcohol most efficiently when fungal enzyme preparations from submerged cultures are used to hydrolyze the starch into sugar. The use of barley malt in the process for conversion of cassava starch has resulted in alcohol yields of 70-74% of the theoretical. Cassava mashes converted by submerged fungal cultures (*Aspergillus niger* van Tieghem, strain NRRL-337) resulted in alcohol yields up to 90% of the theoretical.

Substitutes for the distillers'dried solubles-corn medium were tried. Screened cotton seed meal and soybean meal proved to be a satisfactory substitute for distillers'dried solubles. Dehydrated cassava meal was effectively used in place of corn meal.

A comparative study was carried out using several molds from the Collection of the Instituto Agronômico for the purpose of determining their enzyme activity. The mold that presented the highest enzyme potency was found to be the strain of *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn strain F-27 which had been originally isolated from saké (rice wine).

Studies of the dehydrated residues (7% moisture) from hydrolized and fermented mash were found to contain approximately 25% protein indicating their possible value in animal feeds.

Simple substrates can be used for the propagation of the mold which is a very efficient conversion agent. It is, indeed, the best saccharifying agent for the countries where a good malt is not available at a low price.

LITERATURA CITADA

1. **Almeida, J. R.** *Em* Fabricação do álcool de mandioca, pg. 1-92, Tipografia Jornal de Piracicaba, Piracicaba. 1943.

2. **Banzon, E. I.** e **outros.** Fermentative utilization of cassava. The production of ethanol. Iowa State College Jour. Sci. **23** : 219-235. 1949.

3. **Jalavicharana, K.** Conversion of rice by submerged culture microbial enzyme preparations. Joseph E. Seagram & Sons, Inc., Res. Lab. Report 1710-E : 1-15, tab. 1-6. 1950.

4. **Le Mense, E. H.** e **outros.** Production of mold amylase in submerged culture. Jour. Bact. **54** : 149-159. 1947.

5. **Le Mense, E. H.** e **outros.** Grain alcohol fermentations. Submerged mold amylase as a saccharifying agent. Ind. Eng. Chem. **41** : 100-103. 1949.

6. **Maia, R.** Tiquira. Aguardente de mandioca. Rev. Tecnol. Bebidas **2** (3) : 9-10. 1949.

7. **Stark, W. H.** e **outros.** Laboratory cooking, mashing, and fermentation. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **15** : 443-446. 1943.

8. **Takamine, J.** Enzymes of Aspergillus oryzae and the application of its amyloclastic enzyme to the fermentation industry. The Jour. Ind. Eng. Chem. **6** : 824-828. 1914.

9. **Teixeira, C.** e **outros.** Ethyl alcohol from cassava. Ind. Eng. Chem. **42** : 1781-1783. 1950.

PROCESSO CONTÍNUO PARA FERMENTAÇÕES INDUSTRIAIS (1)

PAUL KOLACHOV, *diretor de pesquisas;* LE ROY A. SMITH, *assistente, laboratório de fermentação;* H. FREDERICK WILLKIE, *vice-presidente,* JOSEPH E. SEAGRAM & SONS, INC., *Louisville, Kentucky, U.S.A.*

1 - INTRODUÇÃO

O emprêgo do processo contínuo para os diversos tipos de fermentações industriais tem encontrado grande aceitação, e, sem dúvida alguma, será utilizado em escala cada vez maior no futuro. Sòmente nestes últimos anos o processo adquiriu importância na produção de álcool e de fermento alimentício (*food yeast*), a partir de substratos especializados, tais como os resíduos sulfíticos da fabricação de papel e a madeira hidrolisada (**1** a **16**). Muitos outros substratos têm sido investigados com o fito de verificar a possibilidade de serem utilizados em processos contínuos para obtenção de produtos diversos. Entre os substratos que têm sido experimentados como matéria-prima para produção de álcool e de fermento, podemos citar os resíduos da indústria de suco de laranja, o melaço de laranja e os resíduos da indústria de conservas de frutas (**17** a **21**). O sôro do leite vem sendo usado num processo contínuo para produção de ácido láctico (**22**, **23**). Verificou-se também que o agente patogênico *Brucella suis* Huddleson pode ser obtido em quantidade apreciável e com bastante segurança por meio de um processo contínuo para sua multiplicação (**24**).

Grande parte das pesquisas realizadas em nosso laboratório tem por objetivo o desenvolvimento de um processo contínuo para produção de álcool e de enzimas segregadas por fungos. Pesquisamos também a possibilidade e viabilidade de um processo contínuo para produção de penicilina. No 4.º Congresso Internacional de Microbiologia, realizado em Copenhague, em 1947, apresentamos um relato sôbre a produção de álcool etílico a partir de mostos de cereais hidrolisados com ácido mineral, empregando um processo contínuo de fermentação. Relatamos ainda um processo contínuo para multiplicação de fermento em destilaria, bem como para as diversas operações na produção de álcool de cereais sacarificados por ação enzimática, excetuando-se a operação de fermentação que continuava a ser pelo processo intermitente.

O presente trabalho tem por escopo relatar os resultados que obtivemos em nossas pesquisas com outros tipos de fermentação, empregando um processo contínuo.

---

(1) Trabalho apresentado ao 5.º Congresso Internacional de Microbiologia, realizado no Rio de Janeiro, Brasil, de 17 a 24 de agôsto de 1950, e traduzido e adaptado pelo engenheiro agrônomo Ciro G. Teixeira, Instituto Agronômico de Campinas, ex-membro do Seagram International Fellowship Program.

2 - PROCESSO CONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE PENICILINA

Estudamos a possibilidade de substituir o processo intermitente (*batch process*) pelo processo contínuo em fermentações mais complexas como é o caso da produção de penicilina (**25**). Não visamos obter maior rendimento ou reduzir o período de fermentação. O objetivo primário foi o de verificar se seria possível manter condições uniformes e invariáveis durante o processo de operação contínua. Procedeu-se do seguinte modo: colocou-se na dorna o meio de cultura comumente usado pela indústria para a produção de penicilina pelo processo intermitente. Êste meio consiste em 3% de concentrado de água de lavagem do milho (*corn steep solids*), 3% de lactose e 1% de carbonato de cálcio. Após a esterilização, o meio é semeado com 5% (calculados sôbre o volume total do meio de cultura existente na dorna) de cultura pura de *Penicillium chrysogenum* Thom, estirpe Q 176 da Universidade de Wisconsin. Deixa-se o fungo multiplicar durante 48 horas, a fim de permitir um bom desenvolvimento micelial. Inicia-se agora a operação contínua, retirando-se parte do meio de cultura da dorna e adicionando-se igual quantidade de meio de cultura esterilizado. Esta operação é realizada de modo que, num período de 48 horas, seja retirado um volume de produto fermentado igual ao volume total do meio de cultura existente na dorna, isto é, o ciclo total é de 48 horas. Depois de cada 12 horas de operação contínua, é adicionado à dorna 0,01% de ácido fenilacético. Estas experiências realizadas mostraram que o meio de cultura utilizado no processo intermitente para produção de penicilina não era adequado para uso no processo contínuo, visto não ter sido possível manter condições uniformes durante a operação contínua (fig. 1). Verifica-se que, após 48 horas de operação contínua, a capacidade para produzir penicilina decresce gradualmente, ao passo que o pH tende a se elevar. Entretanto, quando se adicionaram ao meio de cultura já descrito 0,5% de glicose, foi possível a manutenção de condições uniformes durante a operação contínua quando se trabalhou com um ciclo de operação contínua não muito longo, isto é, cêrca de 96 horas em operação contínua (fig. 1). Após operar durante 48 horas continuamente, observa-se que a capacidade para produção de penicilina se mantém constante. O pH do meio de cultura conserva-se também constante. Estas experiências preliminares demonstraram que é possível o emprêgo de um processo contínuo para produção de penicilina. Atualmente, estão sendo realizados estudos a fim de averiguar a possibilidade de ampliar o período de operação contínua, bem como tentar aumentar o rendimento em penicilina e reduzir o ciclo de fermentação.

3 - ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS

Continua a ser objeto de investigações intensivas em nosso laboratório, o aperfeiçoamento de processos para produção contínua de enzimas amilolíticas, em culturas submersas de fungos (**26**). No trabalho apresentado ao 4.º Congresso Internacional de Microbiologia, apresentamos resultados obtidos nas pesquisas preliminares sôbre a produção de enzimas amilolíticas

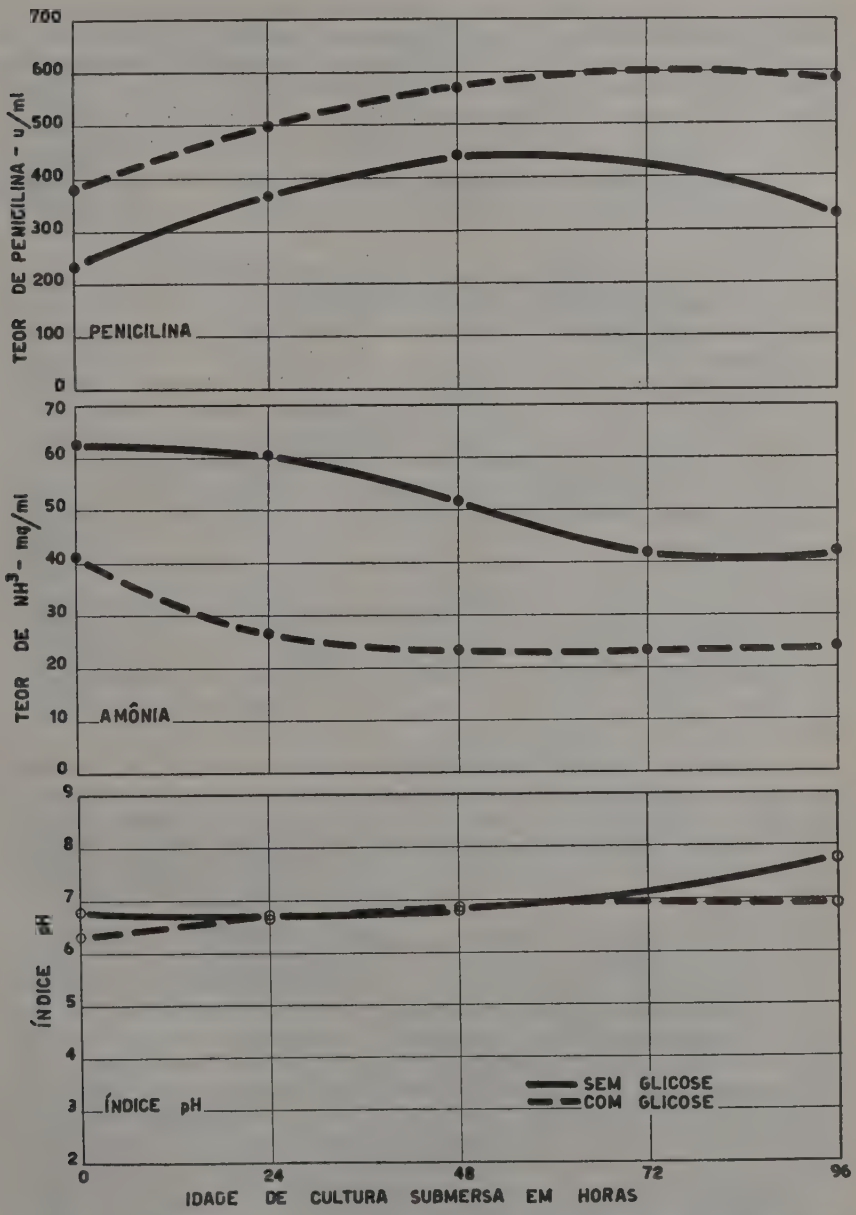


Figura 1.—Variação dos teores de penicilina, amônia e do índice pH, em diferentes fases do processo de fermentação contínua para produção de penicilina, em substratos com e sem glicose.

por meio de culturas submersas de fungos. Os resultados obtidos evidenciaram a potencialidade destas culturas como agentes de sacarificação do amido de vários substratos utilizados nas destilarias de álcool etílico. Em virtude de não têrmos ainda concluído as investigações sôbre o processo contínuo para produção de enzimas em culturas submersas de bolores, apresentaremos apenas um relato dos resultados obtidos até o momento.

O processo utilizado originalmente para o cultivo submerso de bolor para obtenção de enzimas amilolíticas pode ser descrito, em linhas gerais, como segue :

A cultura submersa de *Aspergillus niger* Van Tieghem, estirpe n.º 337 do Northern Regional Research Laboratory, Illinois, EE. UU., é propagada a uma temperatura de 30ºC. O substrato utilizado consiste em vinhaça filtrada([1]), à qual se adiciona de 1 a 3% de milho moído e 0,5% de carbonato de cálcio. Inicia-se a operação contínua cêrca de 48 horas após a semeadura do substrato com cultura pura de *Aspergillus niger*. Adotou-se na operação contínua um ciclo total de 48 horas. Denomina-se ciclo total o tempo necessário para retirar um volume total de cultura submersa igual ao volume total de substrato existente no propagador da cultura submersa. Um agitador tipo turbina é utilizado para provocar a dispersão do ar esterilizado introduzido para o arejamento da cultura. A agitação produz também uma uniformização do meio de cultura. Um arejamento satisfatório é obtido pela introdução de uma quantidade de ar igual a ¼ do volume total de meio existente no propagador, por minuto. Quando se trabalha com um grande volume de cultura submersa, 1/8 de volume de ar, baseado no volume total de meio a arejar, é suficiente para produzir um bom arejamento. O sistema consistiu em um único propagador e a duração da operação contínua foi limitada a cinco dias.

A análise das culturas submersas obtidas mostrou que as três enzimas, alfa-amílase, máltase e dextrinase limite([2]) provàvelmente são as mais importantes na sacarificação do amido. Destas três enzimas, a máltase sofreu um decréscimo significativo em sua atividade durante a operação contínua (fig. 2). Verificou-se também que os mostos de cereais sacarificados com cultura submersa retirada, em dias consecutivos, do propagador que estava trabalhando em operação contínua, e depois fermentados, mostraram um decréscimo no rendimento alcoólico (fig. 3). Mostos sacarificados com culturas submersas do propagador que, havia 24 horas, estava trabalhando em operação contínua, apresentaram um rendimento alcoólico de 5,5 p.g./-bu.([3]). Mostos sacarificados com culturas submersas do propagador que, havia 96 horas, estava trabalhando em operação contínua, apresentaram um rendimento alcoólico de 4,8 p.g./bu. Êste decréscimo no rendimento alcoólico se correlaciona com a idade da cultura submersa utilizada na sacarificação do mosto e está também em correlação com o decréscimo da

([1]) Tradução da expressão inglêsa *distillers'thin stillage*.

([2]) Tradução da expressão inglêsa *limit dextrinase*.

([3]) Abreviação da expressão inglêsa *proof gallons per bushel*. Esta expressão indica a quantidade de álcool a 50% obtida de cada "bushel" de cereal fermentado. No caso citado, o rendimento foi de 5,5 galões de álcool a 50%, obtido de cada "bushel" de cereal fermentado.

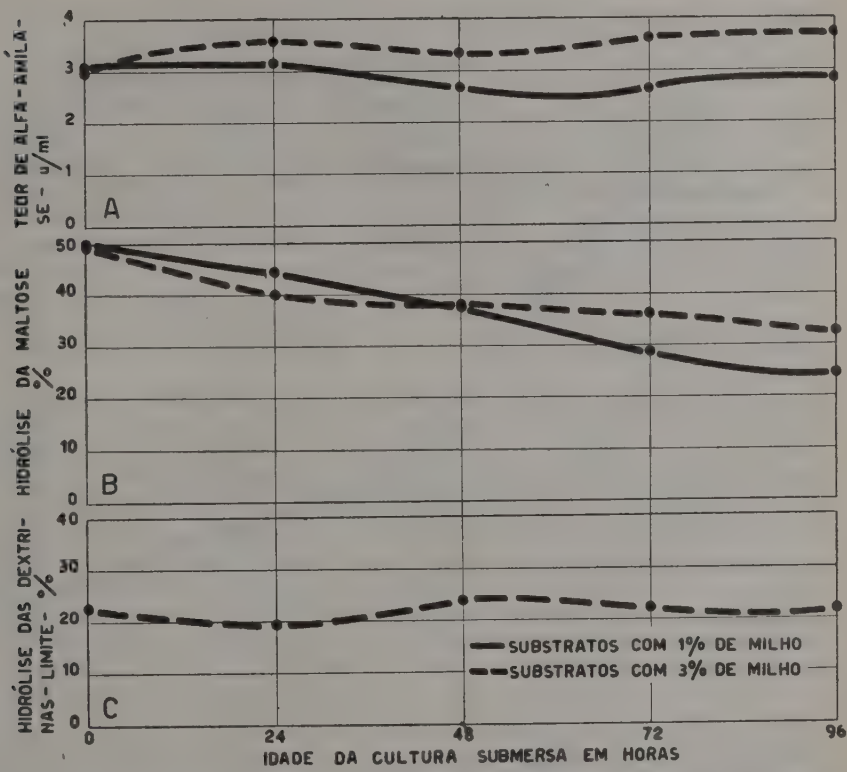


FIGURA 2.—Variação do poder enzimático, em diferentes fases do processo de propagação contínua de *Aspergillus niger* em substrato com 1% e 3% de milho. *A*-Unidades de alfa-amílase. *B*-Atividade da máltase (percentagem de maltose transformada em glicose). *C*-Atividade da dextrinase-limite (percentagem de dextrinas-limite transformada em glicose).

atividade da máltase nas culturas submersas retiradas, em dias consecutivos, do propagador trabalhando em operação contínua.

O decréscimo no rendimento alcoólico pôde ser atenuado pela modificação na composição do meio de cultura utilizado na propagação do bolor, bem como pela introdução de certas modificações na operação de cultivo do bolor. As modificações introduzidas consistiram em abaixar a temperatura de multiplicação do fungo para 25°C e em elevar a concentração de milho, no meio de cultura, utilizado para o cultivo do bolor. Mesmo assim, verificou-se um decréscimo no rendimento alcoólico dos mostos sacarificados com culturas submersas mais velhas, retiradas do propagador trabalhando em operação contínua (fig. 3). Entretanto, o rendimento alcoólico de mostos sacarificados com cultura submersa, retirada de um propagador, que estava trabalhando contìnuamente durante uma semana, foi ainda

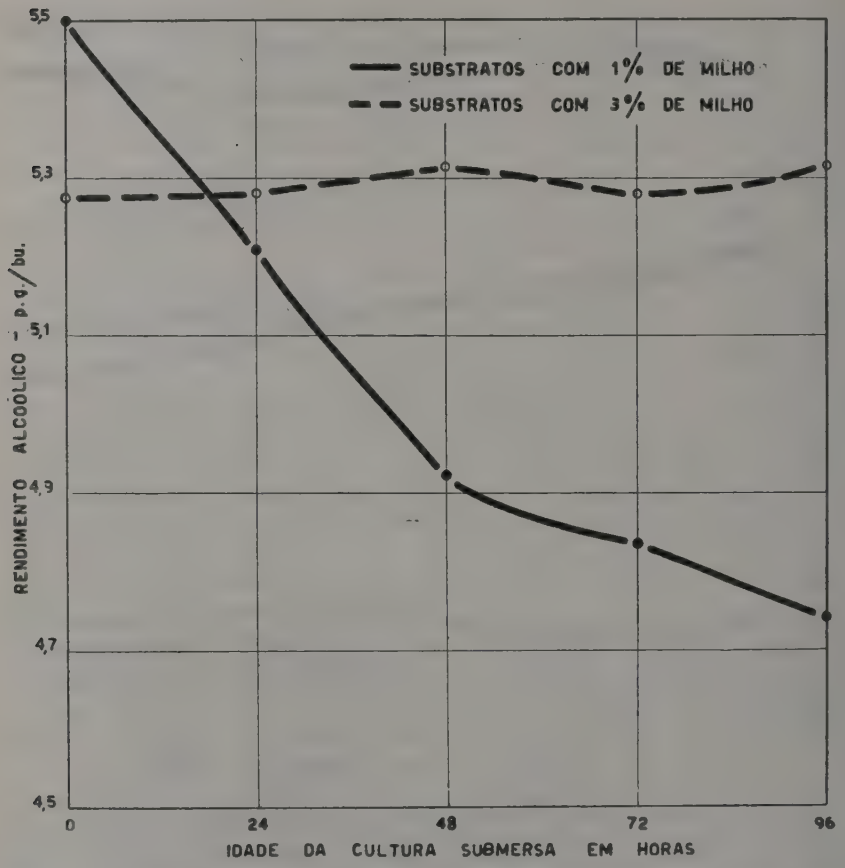


FIGURA 3.—Variação do rendimento alcoólico em mostos sacarificados por culturas submersas, obtidas em diferentes fases do processo de propagação contínua, usando substratos com 1% e com 3% de milho.

igual ao de mostos sacarificados com malte de cevada. Conclui-se, das experiências citadas, que o processo contínuo para produção de uma preparação enzimática não é um problema tão simples como possa parecer à primeira vista. É um problema muito mais complexo que o da produção contínua de penicilina, fermento ou álcool. O estudo das diversas enzimas, que atuam na sacarificação do amido, mostra maior correlação entre a atividade da máltase e o rendimento alcoólico. Não se pôde provar se a atividade da máltase é responsável, de per si, pela variação no rendimento alcoólico de mostos sacarificados com culturas submersas de bolores, ou se outros fatôres exercem também influência nesta variação no rendimento alcoólico.

4 - PRODUÇÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO

Diversos processos foram investigados para a produção de álcool etílico em um sistema contínuo. Utilizamos em nossas experiências vários substratos e variamos também a aparelhagem empregada. Quando se realizou o 4.º Congresso Internacional de Microbiologia, em 1947, apresentamos um trabalho referente a um processo de fermentação contínua de mostos de cereais, hidrolisados com ácidos minerais (27). Vamos relatar agora dois processos para a fermentação contínua de mostos de cereais sacarificados com culturas submersas de bolor e um outro processo para a fermentação contínua do melaço.

4.1 - SACARIFICAÇÃO POR MEIO DE CULTURA SUBMERSA DE BOLOR

Quando a sacarificação dos mostos de cereais é realizada por ação enzimática e o mosto sacarificado vai alimentar um sistema de fermentação contínua, a utilização de enzimas segregadas por fungos é a que oferece maiores vantagens. Estas preparações enzimáticas podem ser obtidas em condições assépticas, e o processo para multiplicação do fungo é relativamente simples e econômico. O emprêgo do malte não é recomendado, por se tratar de um produto que quase sempre contém certa percentagem de bactérias, bolores e outros microrganismos. A utilização do malte no sistema em operação contínua resultará numa multiplicação dêsses agentes contaminantes que certamente irão provocar fermentações indesejáveis com consequente redução no rendimento alcoólico. Além disso, o produto final resultante da fermentação nunca poderá ser uniforme.

As principais vantagens, oferecidas pelo uso de culturas submersas de fungos, são as seguintes : a) o preço de custo da operação de sacarificação é menor que o da sacarificação pelo malte ; b) substratos simples podem ser utilizados como meio de cultura para a multiplicação do fungo, constituindo um agente de sacarificação bastante viável nos países onde há escassez de bom malte ou onde o preço do malte seja excessivamente elevado ; c) a operação de fermentação pode ser realizada assèpticamente, obtendo-se mostos livres de contaminantes ; d) a sacarificação é mais eficiente que pelo uso de malte de cevada ; e) as culturas submersas de fungos possuem teor elevado de elementos nutritivos para o fermento alcoólico, possibilitando a preparação de mostos de substratos pobres em fatôres de crescimento para o fermento.

4.2 - PROCESSO AMILO

Realizamos experiências em que a sacarificação dos mostos de cereais foi conduzida pelo processo amilo (26). Os resultados obtidos foram comparados com os conseguidos em um outro processo de sacarificação que descreveremos mais adiante. O sistema utilizado para o processo amilo consistiu em dois vasos, sendo que o primeiro recebeu o nome de pré-fermentador e o segundo de fermentador. A goma de cereal, não sacarificada, existente no pré-fermentador, é semeada com 10% (baseados no volume

total de mosto a ser preparado) com cultura submersa de *Aspergillus niger*, estirpe NRRL-337. Após a adição da cultura submersa ao pré-fermentador, inicia-se a operação de arejamento por meio de dispersão mecânica. Por meio dêsse arejamento, obtém-se uma uniformização da goma, ao mesmo tempo que se oferecem condições favoráveis para a secreção enzimática por intermédio do fungo. A goma de cereal sacarificada é transferida para o fermentador onde se processa a fermentação do mosto. O uso dêste processo contínuo deu ótimos resultados. Apresentou, entretanto, duas desvantagens acentuadas: a) é necessário trabalhar com grande volume de mosto e, se houver contaminação, esta acarretará quebra no rendimento alcoólico; b) um tempo prolongado é necessário para preparar o mosto para a fermentação pròpriamente dita, incorrendo dêste modo num aumento do ciclo total de fermentação.

4.3 - FERMENTAÇÃO DO MOSTO PELO PROCESSO "CONVENCIONAL"

O processo para fermentação alcoólica em operação contínua, de mostos de cereais, que recebeu maior atenção em nosso laboratório foi aquêle por nós denominado processo do tipo "convencional". Neste processo, a produção de cultura submersa do fungo e a fermentação constituem operações independentes. Dêste modo, a sacarificação da goma de cereal pode ser realizada do mesmo modo que no processo comum de sacarificação pelo malte, isto é, a cultura submersa do fungo é adicionada à goma não sacarificada em operação que precede à fermentação.

O processo utilizado experimentalmente, até há pouco tempo, consistia na fermentação de mosto de milho sacarificado com 15% (baseados no volume total do mosto a preparar) de cultura submersa de *Aspergillus niger*, estirpe NRRL-337. Uma quantidade suficiente era preparada de modo que pudesse suprir o sistema para fermentação contínua pelo espaço de 24 horas. A fermentação contínua é realizada num sistema constituído por dois fermentadores. O primeiro fermentador, denominado fermentador primário, opera num ciclo de 18 horas, e nêle se processa a maior parte da fermentação, que é completada no fermentador secundário. No fermentador primário, o teor de açúcar do mosto cai de um valor inicial de cêrca de 12% para, aproximadamente, 2%; a população de fermento permanece mais ou menos constante, variando entre 120-140 milhões de células por mililitro de mosto. Um período adicional de 18 horas é requerido para completar a fermentação do mosto no fermentador secundário.

Estudou-se também a influência da percentagem do agente sacarificante utilizado e do ciclo de fermentação sôbre o rendimento alcoólico. Sacarificamos mostos com 10, 15 e 20% (baseados no volume total de mosto a ser preparado) de cultura submersa de *Aspergillus niger* e, em seguida, os mostos obtidos foram fermentados durante 24, 36 e 43 horas. Variou-se o período de fermentação pelo ajustamento do volume do mosto no fermentador secundário. Quando desejávamos um ciclo de fermentação mais curto, retirávamos uma quantidade maior de mosto no fermentador secundário, por unidade de tempo, de modo que o nível no fermentador secun-

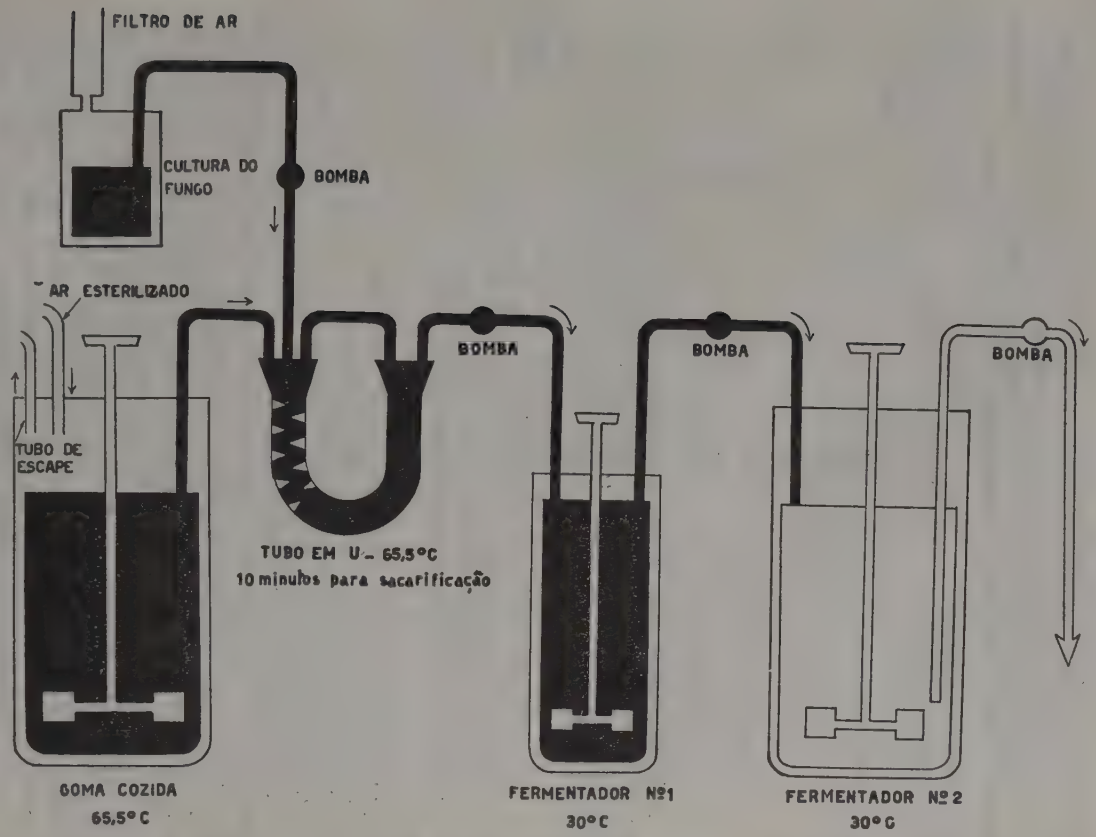


Figura 4.—Aparelhagem utilizada em experiências de fermentação contínua de mostos sacarificados por culturas submersas de fungos.

dário tende a baixar quando se trabalha com um ciclo de fermentação mais curto. A relação seguinte apresenta os rendimentos alcoólicos obtidos de mostos sacarificados com 10, 15 e 20% de cultura submersa de *Aspergillus niger*, utilizando-se ciclos de fermentação de 24, 36 e 43 horas.

PERCENTAGEM DA CULTURA SUBMERSA UTILIZADA NA SACARIFICAÇÃO DA GOMA	CICLO DE FERMENTAÇÃO EM HORAS	*Rendimento alcoólico calculado sôbre a substância original p.g./bu.*
10	24	4,41
10	36	4,64
10	43	5,14
15	24	4,88
15	36	5,27
15	43	5,40
20	24	4,83
20	36	5,30

A fermentação mais rápida, e que deu rendimento alcoólico equivalente ao obtido na fermentação intermitente, de mostos sacarificados com malte, foi obtida pelo emprêgo de 15% de cultura submersa na sacarificação da goma e operando-se num ciclo total de fermentação de 36 horas. O rendimento alcoólico não aumentou, de maneira significativa, pela elevação da percentagem de cultura submersa utilizada na sacarificação da goma. Além disso, operando com um ciclo de fermentação de 36 horas, a fermentação foi incompleta, como evidencia o rendimento alcoólico muito mais elevado obtido de mostos operando com um ciclo de fermentação de 43 horas.

Em experiências mais recentes, o ciclo de fermentação de mostos de cereais sacarificados com 15% de cultura submersa de fungo foi reduzido, em virtude de melhoramentos introduzidos no processo, e pelo desenvolvimento de um método mais eficiente para a produção de culturas submersas. O equipamento melhorado está representado na figura 4. O aparelhamento utilizado permite a alimentação simultânea de um tubo em U com goma não sacarificada e cultura submersa do fungo. Esta mistura permanece no tubo durante aproximadamente 10 minutos e, a seguir, é bombeada para o fermentador primário. O fermentador primário trabalha com um ciclo de 5 horas. O mosto em fermentação é transferido para o fermentador secundário, onde o ciclo de fermentação é regulado pela determinação do rendimento alcoólico ótimo. Um ciclo total de 30 horas foi suficiente para se obterem rendimentos alcoólicos iguais aos obtidos posteriormente, quando se utilizou um ciclo de fermentação total de 36 horas. O ciclo de fermentação de 5 horas para o fermentador primário foi determinado por cálculos baseados nas curvas de multiplicação ou de crescimento (*growth curves*) do fermento alcoólico na fermentação intermitente, de acôrdo com o método de Adams e outros (21). Êste ciclo permite manter a população de fermento constante e a um valor predeterminado.

Modificações no sistema de preparar a cultura submersa do fungo contribuíram bastante para reduzir o ciclo de fermentação; êstes melhoramentos já foram anteriormente mencionados.

4.4 - FERMENTAÇÃO DO MELAÇO

O melaço é a matéria-prima utilizada, em grande escala, para a produção de álcool etílico. O seu baixo preço e a relativa facilidade de se trabalhar com êle nos processos de fermentação têm sido os fatôres principais para torná-lo um competidor para as outras matérias-primas utilizadas na produção do álcool industrial. Entretanto, quaisquer melhoramentos que pudessem ser introduzidos no processo de fermentação do melaço, como, por exemplo, a redução do ciclo de fermentação, poderiam favorecer grandemente na utilização dêste subproduto da indústria açucareira nos processos de fermentação, tornando-o a fonte mais barata para obtenção de álcool.

Estudamos e desenvolvemos em nosso laboratório um processo contínuo para produção de álcool a partir do melaço (28). O melaço utilizado na fermentação é diluído com água, de modo que reduza o teor de açúcar para 12%, e o pH é ajustado entre 4,0 e 4,5. Se o melaço fôr deficiente em nitrogênio ou fosfato, deve-se adicionar sulfato ou fosfato de amônio. O melaço bruto cubano (*Cuban blackstrap molasses*) é melhor que o refinado ou do que o de beterraba, porque não é necessária a adição de sais nutritivos e, além disso, o ciclo de fermentação pode ser reduzido quando se usa êsse melaço.

O pé de fermentação é preparado por arejamento, sendo utilizada uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiæ* Hansen(1). As células são concentradas por centrifugação, e uma quantidade suficiente é adicionada ao fermentador de modo que se obtenha uma população inicial de cêrca de 350 milhões de células por mililitro de mosto. Após um período de incubação estacionário, de cêrca de 5 horas, 91,5% do açúcar são utilizados, e a população de células de fermento se eleva a 550 milhões por mililitro de mosto. Inicia-se a operação contínua e verifica-se ser possível retirar até 25% do volume total do mosto do fermentador por hora, correspondendo a um ciclo total de fermentação de 4 horas. A temperatura ótima de fermentação foi de cêrca de 32°C.

O pé de fermentação é adicionado sòmente no início da operação contínua. Os rendimentos alcoólicos obtidos por êste processo contínuo são equivalentes aos conseguidos pela fermentação intermitente do mesmo melaço num ciclo total de fermentação de 50 horas. As vantagens dêste processo são : a) grande redução no ciclo de fermentação ; b) considerável redução no número e tamanho das dornas requeridas na operação de fermentação.

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

Relatamos os resultados obtidos em nossas investigações sôbre processos de fermentação contínua, bem como experiências realizadas por outros pesquisadores. Estas investigações demonstraram que o processo de fermentação contínua é bastante viável para a produção de álcool etílico.

(1) Estirpe n.º 90 da coleção de Joseph E. Seagram & Sons, Inc., obtida de melaço javanês.

Os resultados obtidos demonstram também a praticabilidade da utilização de um processo contínuo para a produção de um número variado de produtos resultantes de fermentação, tais como fermento alimentício, antibióticos e enzimas. De maneira geral, o processo contínuo é tão econômico como o processo intermitente, com a vantagem de exigir aparelhagem mais reduzida ou, pelo menos, menor. A vantagem indiscutível do processo contínuo baseia-se no fato de ser possível um contrôle mais perfeito, assegurando, dêste modo, a obtenção de um produto mais uniforme em qualidade. Além disso, êsse processo elimina a possibilidade de se trabalhar em um sistema contaminado, o que constitui vantagem marcante na manutenção de um alto "standard" para a qualidade do produto.

SUMMARY AND CONCLUSION

The data which we have presented from some of our investigations and from those of other workers, show that a continuous fermentation process for the production of ethyl alcohol is feasible. This can be accomplished by using a variety of substrates and processes. The data also demonstrate the feasibility of continuous processing for the production of a variety of other fermentation products such as yeast, antibiotics and enzymes. Continuous processing, in general, is at least as economical as batch processing and usually requires less or smaller equipment. The indisputable advantage of continuous processing lies in the high degree of control which it makes possible, thereby insuring uniform quality of the product. In addition, a continuous processing precludes operation of a contaminated system — a distinct advantage in recovery and maintenance of quality standards.

LITERATURA CITADA

1. **Anônimo.** *Em* Fiat Final Report n.º 499, Joint Intelligence Objective Agency, Washington, D. C., U.S.A., 1945.

2. **Anônimo.** Les usines de Melle et Boinot. Patentes canadenses n.º 341.720, 348.549 e 402.847.

3. **Anônimo.** Les usines de Melle et Boinot. Chem. Abst. **32 :** 2683. 1938.

4. **Sankey, C. A.** e **M. M. Rosten.** Alcohol from waste sulfite liquor. Pulp & Paper Mag. Can. **45 :** 171. 1944.

5. **Eriesson, E. O.** Alcohol from sulfite waste liquor. Pulp & Paper Indus. **19 :** 42. 1945.

6. **Anônimo.** *Em* Comercial fermentations, sem pg., Chemical Publishing Co., Inc., no prelo.

7. **Fries, K. W.** Sulfite waste utilization by Wisconsin plant. Lake States Timber Digest **2 :** 6. 1948.

8. **Harris, E. E.** e **outros.** Fodder yeast from wood hydrolyzates and still residues. Ind. Eng. Chem. **40 :** 1220. 1948.

9. **Harris, E. E.** e **outros.** Production of food yeast from wood hydrolyzates. Ind. Eng. Chem. **40 :** 2068. 1948.

10. **Anônimo.** Food yeast production and utilization in Germany. Skagg Report U. S. Dept. Commerce, Office of Technical Service, Washington, D. C., U.S.A., sem data.

11. **Fritzweiler, R. e outros.** Four years'working of wood saccharification at Tornesch. Chem. Abst. **31 :** 7588. 1937. (Zeitung für Spiritusind. **59 :** 229. 1936).

12. **Fritxweiler, R.** e **W. Karsch.** Latest progress in wood saccharification according to the Scholler-Tornesch process. Chem. Abst. **33 :** 1492. 1939. (Zeitung für Spiritusind. **61 :** 207. 1938).

13. **Schaal, O.** Present status of the Scholler-Tornesch procedure for saccharification of cellulosic materials. Cellulose Chem. **16 :** 7. 1935.

14. **Scholler, H.** e **R. Eichenmeyer.** Die Gewinnung von Zucker, Spiritus und Futterhefe aus Holz als Rohstoff. Chem. Zeit. **60 :** 293. 1936. (Patentes dos Estados Unidos da América do Norte n.os 2.083.347 e 2.083.348, 1934).

15. **Scholler, H.** e **M. Seidel.** Yeast production and fermentation. Chem. Abst. **34 :** 3876. 1940. (Patente dos Estados Unidos da América do Norte n.° 2.188.192, 1937).

16. **Karsch, W.** Alcohol production by fermentation. Chem. Abst. **33 :** 5590. 1939 (Patente dos Estados Unidos da América do Norte n.° 2.155.134, 1939).

17. **Ramage, W. D.** e **J. H. Thompson.** Producing yeast from processing wastes. *Em* Yeasts in feeding, pg. 87-88, 1950, Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.

18. **Anônimo.** *Em* Food yeast, Colonial Food Yeast, Ltd., Brook House, Londres, maio, 1944.

19. **Veldhuis, M. K.** U. S. Department Agric., Agric. Chem. Res. Div. Contrib. 222, sem data.

20. **Veldhuis, M. K.** e **outros.** Citrus Products Station, Winter Haven, U.S.A., não publicado.

21. **Adams, S. L.** A study of fermentation processes for the utilization of fruit wastes. Tese apresentada ao Washington State College, Pullman, U.S.A., 1949.

22. **Whittier, E. O.** e **L. A. Rogers.** Continuous fermentation in the production of lactic acid. Ind. Eng. Chem. **23 :** 532. 1931.

23. **Olive, T. H.** Waste lactose is raw material for a new lactic acid process. Chem. and Met. Eng. **43 :** 480. 1936.

24. **Gerhardt, P.** Brucella suis in aerated broth culture. Jour. Bact. **52 :** 283. 1946.

25. **Schneider, W. C. e outros.** Laboratory continuous penicillin fermentation. Trabalho apresentado na 114.ª Reunião da "American Chemical Society", Estados Unidos da América do Norte. 1948.

26. **Anônimo.** Continuous production of amylolytic fungal enzymes by submerged cultivation. Relatórios não publicados de Joseph E. Seagram & Sons, Inc., Louisville, Ky., Estados Unidos da América do Norte, 1948.

27. **Ruf. E. W.** e **outros.** Alcoholic fermentation of acid-hydrolyzed grain mashes. Ind. Eng. Chem. **40 :** 1154. 1948.

28. **Bilford, H. R.** e **outros.** Alcoholic fermentation of molasses. Ind. Eng. Chem. **34 :** 1406. 1942.

MOSAICO DA CITRONELA

A. S. Costa, *engenheiro agrônomo, Secção de Genética,* A. R. Lima e A. Jacob, *engenheiros agrônomos, Secção de Fumo, Plantas Inseticidas e Medicinais, Instituto Agronômico de Campinas*

A cultura da citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) ainda não está estabelecida no Brasil. Estudos sôbre a sua adaptação no Estado de São Paulo e sôbre os métodos mais adequados ao seu cultivo estão em andamento no Instituto Agronômico (1). Observações feitas em pequenas plantações, na Estação Experimental Central em Campinas, mostraram que esta planta é bastante suscetível a uma forma de mosaico. Os sintomas do mosaico da citronela são bastante semelhantes aos do mosaico da cana de açúcar (*Saccharum* spp.), e as experiências e observações efetuadas indicam que o vírus causador pertence ao grupo do vírus do mosaico da cana (*Marmor sacchari* H.).

1 - IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Sendo a citronela planta ainda não cultivada em escala comercial no Estado, a importância econômica atual do mosaico é nula. Esta moléstia é, entretanto, de importância econômica potencial, caso esta cultura venha a implantar-se em São Paulo.

Os prejuízos causados pelo mosaico da citronela são de duas naturezas : *a*) as plantas afetadas produzem menor quantidade de fôlhas que as plantas sadias ; *b*) observações preliminares têm mostrado que a percentagem de óleo de citronela das plantas com mosaico é cêrca de 25 por cento menor que das plantas sadias.

Sendo o mosaico da citronela causado pelo mesmo vírus que origina o mosaico da cana, as plantas de citronela poderão servir de fonte de vírus para as plantações de cana de açúcar, e vice-versa.

2 - SINTOMAS

As plantas afetadas de citronela mostram sintomas de mosaico das fôlhas (est. 1-*A*). O tipo de mosaico é formado por áreas verde-claras alongadas que se alternam com áreas de côr verde normal. O tamanho das plantas não é, em geral, muito reduzido, mas há plantas que permanecem bastante definhadas quando afetadas.

3 - TESTES COMPARATIVOS

Numerosos ensaios comparativos de inoculação foram feitos com o vírus do mosaico da citronela e do mosaico da cana de açúcar. Os vírus

(1) As poucas mudas com que se iniciou a cultura vieram de Mayaguez, Pôrto Rico.

das duas proveniências foram comparados por inoculação em plantinhas de sorgo, em plantas de linhas puras e variedades de milho, e em *seedlings* de citronela e de cana de açúcar. Os resultados destas inoculações estão reproduzidos no quadro 1 e indicam que o comportamento dos dois vírus foi o mesmo. Também nenhuma diferença foi observada nos sintomas causados pelos dois vírus nas plantas inoculadas.

QUADRO 1.—Inoculação comparativa (1) de várias plantas com os vírus do mosaico da citronela e do mosaico da cana de açúcar

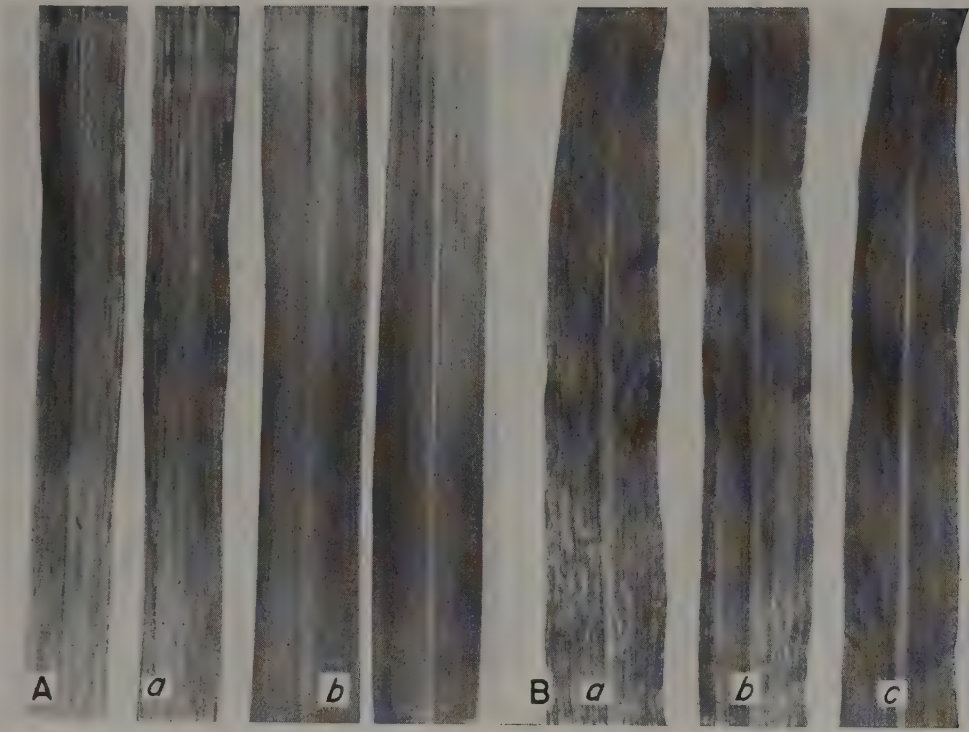
Planta inoculada	Vírus do mosaico da citronela			Vírus do mosaico da cana de açúcar		
	Plantas		Percentagem de infecção	Plantas		Percentagem de infecção
	Inoculadas	Infetadas		Inoculadas	Infetadas	
	N.º	N.º	%	N.º	N.º	%
Sorgo (2)	98	16	16,3	94	33	35,1
Linhas puras de milho (3)	248	75	30,2	248	135	54,4
Variedades de milho (4)	1 100	970	88,2	1 100	998	90,7
Seedlings de citronela	218	218	100	218	218	100
Seedlings de cana de açúcar	380	193	50,7	380	192	50,5

(1) Inóculo diluído 1:5 com sulfito de sódio a 0,01 M
(2) Totais de 10 variedades
(3) Totais de 31 linhas puras
(4) Totais de 110 variedades

Em outra série de ensaios compararam-se as propriedades físicas do vírus causador do mosaico da citronela com aquelas do vírus do mosaico da cana de açúcar. Os testes foram feitos por inoculação mecânica de plantinhas novas de milho (1), e os resultados estão reproduzidos no quadro 2.

QUADRO 2.—Resultados dos testes comparativos para determinação das propriedades físicas do vírus do mosaico da citronela e do mosaico da cana de açúcar, efetuados com planta de milho

Resistência à diluição			Inativação termal			Envelhecimento *in vitro*		
Diluição do inóculo	Plantas infetadas, de 15 inoculadas com o vírus da		Temperatura em °C	Plantas infetadas, de 30 inoculadas com o vírus da		Período de envelhecimento em horas	Plantas infetadas, de 30 inoculadas com o vírus da	
	Citronela	Cana de açúcar		Citronela	Cana de açúcar		Citronela	Cana de açúcar
	N.º	N.º		N.º	N.º		N.º	N.º
Não diluído	15	15	N/aquec.	30	30	0	13	19
10^{-2}	11	11	50	6	5	7	2	19
10^{-3}	2	5	55	0	1	9	1	13
10^{-4}	0	1	60	0	0	24	0	6
10^{-5}	0	1	65	0	0	48	0	0



A — Fôlhas de citronela; *a* — de planta afetada pelo mosaico; *b* — de planta sadia. *B* — Fôlhas de plantinhas de milho; *a* — infetada pelo vírus do mosaico da cana de açúcar; *b* — infetada pelo vírus do mosaico da citronela; *c* — fôlha sadia.

Pode-se afirmar, de maneira geral, que as propriedades físicas dos dois vírus não diferem significantemente. Há pequena indicação de que o inóculo obtido de plantas de cana de açúcar é um pouco mais ativo do que aquêle obtido de citronela. Foi também verificado que o vírus presente em suco obtido de fôlhas de cana de açúcar infetadas pelo mosaico permaneceu ativo *in vitro* por mais tempo do que o vírus obtido de fôlhas de citronela.

4 - TRANSMISSÃO DO MOSAICO DA CITRONELA

Nos ensaios efetuados, o vírus causador do mosaico da citronela tem sido transmitido por inoculação mecânica. Notou-se que os *seedlings* de citronela são muito mais fàcilmente infetados pelo mosaico do que os *seedlings* de cana de açúcar. Isto se verificou tanto quando o inóculo era proveniente de citronela como da cana de açúcar.

Ainda não foram determinados quais são os insetos vetores responsáveis pela transmissão do mosaico sob condições naturais em plantações de citronela. É de se presumir que seja transmitido pelos mesmos vetores do mosaico da cana de açúcar. Falta também determinar se os casos de infecção de plantas de citronela resultam de vetores virulíferos provenientes de plantações de cana ou se há também disseminação de citronela para citronela.

5 - CONTRÔLE

Há várias medidas que podem ser postas em prática com a finalidade de controlar o mosaico da citronela : *a*) contrôle por isolamento das plantações e arrancamento das plantas afetadas ; *b*) criação de variedades resistentes ; *c*) seleção de variedades ou clones tolerantes ; *d*) multiplicação de clones invadidos por estirpes fracas do vírus causador do mosaico.

O isolamento e arrancamento das plantas afetadas (*roguing*) é mais indicado para o caso de plantações destinadas ao fornecimento de mudas. Nesse caso seria conveniente que a plantação fôsse feita em local isolado, longe de outras plantações de citronela ou de cana. Periòdicamente, as plantas deveriam ser inspecionadas, praticando-se o arrancamento e destruição de tôdas que se apresentassem afetadas pelo mosaico, como é praticado, com bons resultados, para a cana de açúcar (2).

O problema da seleção de variedades ou clones resistentes não parece bastante promissor, principalmente a partir de material genético existente em São Paulo. Nos testes de inoculação efetuados com mudinhas obtidas a partir de sementes têm sido obtidos 100 por cento de infecção, indicando isto que não existem fatôres para resistência no material que foi introduzido. Guenther (3) refere-se a duas espécies de citronela, *Cymbopogon winterianus* e *C. nardus* Rendle. *C. winterianus* é a mais cultivada em Java e produz óleo de melhor qualidade. É, entretanto, mais exigente quanto ao solo, sendo, aparentemente, planta menos rústica. *C. nardus* é mais cultivada no Ceilão, dá óleo de qualidade algo inferior, mas é planta

mais rústica. A introdução de outras variedades destas duas espécies é aconselhável, pois é possível que o material introduzido anteriormente em São Paulo represente apenas um clone, não podendo oferecer a variabilidade genética necessária para melhoramento.

É possível que o estudo de *seedlings* de citronela infetados pelo mosaico venha mostrar que alguns são mais tolerantes à moléstia que outros. Caso essa tolerância seja bastante grande, tornar-se-á possível a obtenção de clones que, embora afetados pelo mosaico, sejam capazes de produzir satisfatòriamente.

Outra possibilidade digna de estudos seria a da introdução de estirpes fracas do vírus do mosaico em clones de citronela, a fim de verificar se as plantas invadidas ficam protegidas contra a invasão por estirpes causadoras de sintomas mais severos.

SUMMARY

A type of mosaic is commonly found in experimental fields of the citronella plant (*Cymbopogon winterianus*) in the State of São Paulo.

Inoculation tests carried out with the viruses of citronella and sugar cane mosaic showed that the symptoms induced by both viruses on a number of host plants were alike. The results of these tests and those obtained in a comparative study of some properties of the two viruses indicated that the citronella mosaic virus belongs to the sugar cane mosaic virus complex.

LITERATURA CITADA

1. **Arruda, Spencer, C.** As doenças da cana de açúcar no Estado de São Paulo IV. O Biológico **12** : 123-124. 1946.

2. **Costa, A. S.** e **M. P. Penteado.** O milho como planta-teste para o vírus do mosaico da cana de açúcar. Bragantia **10** : 93-94. 1950.

3. **Guenther, Ernest.** *Em* The essential oils. D. Van Nostrand, Inc. Nova York. **4** : 67. 1950.

ANÁLISE DE UM EXPERIMENTO PARA COMBATE DE VIRA-CABEÇA DO TOMATEIRO(1)

C. G. Fraga Jr., *engenheiro agrônomo, Secção de Técnica Experimental e Cálculo* e A. S. Costa, *engenheiro agrônomo, Secção de Genética, Instituto Agronômico de Campinas*

1 - INTRODUÇÃO

Em experiências realizadas anteriormente (2) foi estudada a eficiência de vários inseticidas no contrôle de vira-cabeça do tomateiro, pela destruição do vetor. Nestes ensaios compararam-se concentrações progressivas de cada inseticida, procurando-se atingir a máxima suportada pela planta, sem demasiado dano. Desta maneira poder-se-ia determinar a concentração mais adequada a ser empregada, pois esta depende de sua eficiência na destruição do vetor e dos efeitos prejudiciais que o inseticida possa exercer sôbre a planta.

Com base nos resultados obtidos, nova série de ensaios foi planejada, para estudar o efeito comparativo dos diferentes inseticidas nas concentrações mais indicadas. Neste trabalho daremos os resultados obtidos no primeiro ensaio desta segunda série de experiências e sua análise estatística detalhada.

2 - MATERIAL E MÉTODO

Os inseticidas comparados e doses respectivas acham-se incluídos na relação seguinte :

TRATAMENTO		*Concentração do produto comercial*
Número	Inseticidas	
0	Testemunha	------
1	Rhodiatox	1,00 %
2	Rhodiatox	0,50 %
3	Rhodiatox	0,25 %
4	Hexason 2540 M	0,50 %
5	Hexason 2540 M	0,25 %
6	Toxafeno	0,50 %
7	Toxafeno	0,25 %
8	Tártaro emético	0,50 %
9	Tártaro emético	0,25 %
10	Fosfern	0,50 %
11	Fosfern	0,25 %
12	Fosfern	0,125 %

O princípio ativo em Rhodiatox e Fosfern é o tiofosfato de dietil paranitrofenila. Em Rhodiatox, sua concentração é de 5%, ao passo que é de 20% em Fosfern. Devido à diferença em concentração, o tratamento 10 corres-

(1) Trabalho a ser apresentado no 5.º Seminário de Estatística, a se realizar em Curitiba, em novembro de 1950.

ponde a um tratamento com 2,0% de Rhodiatox, e os tratamentos 11 e 12 correspondem aos tratamentos 1 e 2 (1,0% e 0,5% de Rhodiatox), respectivamente. Êstes inseticidas foram pulverizados, tendo-se adicionado açúcar ao tártaro emético, na proporção de um por cento.

Quanto ao número de aplicações, seguiu-se a mesma orientação dos ensaios anteriores, procurando-se fazê-las com bastante frequência, a fim de que a falta de ação de determinado tratamento não pudesse ser atribuída à deficiência no número de pulverizações. Foi feita uma pulverização na ocasião do transplante e as outras em intervalos de 3 a 6 dias, até 35 dias após a transplantação.

Os 13 tratamentos foram comparados em um delineamento em blocos incompletos balanceados, usando-se blocos de 4 tratamentos e 4 repetições. Cada um dos canteiros utilizados compreendia um total de 30 plantas dispostas em 3 fileiras de 10 plantas.

3 - ANÁLISE DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Uma experiência em blocos incompletos balanceados consiste no arranjo de **v** tratamentos em **b** blocos de **k** canteiros cada um dêles, onde $\mathbf{k} < \mathbf{v}$. Êste delineamento obedece às mesmas condições que regem os blocos ao acaso, menos àquela que requer que todos os tratamentos ocorram em todos os blocos. Esta condição é substituída pela seguinte : Um tratamento v_i ocorre em um mesmo bloco que o tratamento v_j um número constante de vêzes. Na experiência que estamos considerando, os valores caraterísticos são os seguintes :

$$b = v = 13\,;\quad r = k = 4\,;\quad \lambda = 1.$$

As abreviações **r** e **k** representam repetições e número de tratamentos em um bloco, respectivamente, e λ indica o número de vêzes em que dois tratamentos ocorrem em um mesmo bloco. Análises de experiências dêste tipo podem ser encontradas em Fisher e Yates (3) e Cochran e Cox (1).

3.1 - ANÁLISE DO NÚMERO DE PLANTAS SADIAS

No quadro 1 representamos a distribuição dos tratamentos dentro dos blocos e o número de plantas sadias correspondente a cada tratamento.

QUADRO 1.– Delineamento da experiência e número de plantas não afetadas pelo vira-cabeça, por canteiro de 30 plantas

Número dos blocos	Disposição dos canteiros e respectivos números de plantas sadias				Número total de plantas
1	1 29	0 19	3 24	9 25	97
2	11 27	1 27	7 21	12 25	100
3	11 27	6 28	10 28	0 22	105
4	3 25	2 28	5 29	11 29	111
5	10 29	8 27	3 27	7 28	111
6	2 25	0 21	12 25	8 27	98
7	10 30	2 25	1 28	4 25	108
8	5 24	0 17	7 23	4 26	90
9	5 24	10 30	12 27	9 30	111
10	2 27	9 22	7 23	6 24	96
11	8 26	9 28	11 28	4 28	110
12	6 18	12 29	4 23	3 24	94
13	6 23	1 27	5 24	8 28	102

Êsses resultados devem ser considerados, para a análise estatística, como sendo proporções entre o número de plantas sadias e o número total de plantas. Por conseguinte, não serão analisados sob essa forma, mas após a transformação, de acôrdo com a seguinte fórmula (4) :

$$p = \text{sen}^2 \varphi.$$

O quadro 2 contém os dados transformados.

QUADRO 2.—Ângulo correspondente ao número de plantas sadias

Bloco	TRATAMENTOS													Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	52,7	79,5	----	63,4	----	----	----	----	----	65,9	----	----	----	261,5
2	----	71,6	----	----	----	----	----	56,8	----	----	----	71,6	65,9	265,9
3	58,9	----	----	----	----	----	75,0	----	----	----	75,0	71,6	----	280,5
4	----	----	75,0	65,9	----	79,5	----	----	----	----	----	79,5	----	299,9
5	----	----	----	71,6	----	----	----	75,0	71,6	----	79,5	----	----	297,7
6	56,8	----	65,9	----	----	----	----	----	71,6	----	----	----	65,9	260,2
7	----	75,0	65,9	----	65,9	----	----	----	----	----	90,0	----	----	296,8
8	48,8	----	----	----	68,6	63,4	----	61,1	----	----	----	----	----	241,9
9	----	----	----	----	----	63,4	----	----	----	90,0	90,0	----	71,6	315,0
10	----	----	71,6	----	----	----	63,4	61,1	----	58,9	----	----	----	255,0
11	----	----	----	----	75,0	----	----	----	68,6	75,0	----	75,0	----	293,6
12	----	----	----	63,4	61,1	----	50,8	----	----	----	----	----	79,5	254,8
13	----	71,6	----	----	----	63,4	61,1	----	75,0	----	----	----	----	271,1
Total	217,2	297,7	278,4	264,3	270,6	269,7	250,3	254,0	286,8	289,8	334,5	297,7	282,9	3593,9

A variância teórica de φ, quando medida em graus, tem o valor de

$$V\phi = \frac{820,7}{n}.$$

A variância residual, obtida a partir dos resultados em aprêço, tem o valor de 46,95, com 27 graus de liberdade.

Com êsses dados torna-se possível realizar um teste de χ^2,

$$\chi^2 = \frac{(27)\ (46,95)\ (30)}{820,7} = 46,33^*,$$

cuja probabilidade é de $0,01 < P < 0,02$, de forma que, na análise da variância dos resultados transformados, a variância a ser utilizada será a calculada a partir dos mesmos.

Yates analisou experiências dêste tipo de duas maneiras : com e sem recuperação da informação entre-blocos.

3.1.1 - ANÁLISE SEM RECUPERAÇÃO DA INFORMAÇÃO ENTRE-BLOCOS

Usando o primeiro tipo de análise, obtemos, a partir do quadro 2, duas séries de resultados. Os primeiros, que designaremos como T_s, são os totais correspondentes ao tratamento s. A outra série, designada como B_s, é

constituída pela soma dos totais dos blocos que contém o tratamento s. A partir dêsses dois grupos de resultados obtemos os valores Q_s, onde ... $Q_s = 4T_s - B_s$.

Êstes resultados são apresentados no quadro 3.

QUADRO 3.—Cálculo dos valores B_s, Q_s e produções corrigidas T'_s (sem recuperação da informação entre-blocos), baseado nos ângulos correspondentes ao número de plantas sadias

Tratamentos	T_s	B_s	Q_s	T'_s
0	217,2	1044,1	— 175,3	222,5
1	297,7	1095,3	95,5	305,9
2	278,4	1111,9	1,7	277,0
3	264,3	1113,9	— 56,7	259,0
4	270,6	1087,1	— 4,7	275,0
5	269,7	1127,9	— 49,1	261,3
6	250.3	1061,4	— 60,2	257,9
7	254,0	1060,5	— 44,5	262,8
8	286,8	1122,6	24,6	284.0
9	289,8	1125,1	34,1	286,9
10	334,5	1190,0	148,0	322,0
11	297,7	1139,9	50,9	292,1
12	282,9	1095,9	35,7	287,4
Total	3593,9	14375.6	0,0	3593,8

Da maneira usual, obtemos a soma dos quadrados correspondentes a blocos, e a soma dos tratamentos é dada por

$$\frac{t - 1}{rtk\ (k - 1)}\ SQ_s^2 = 1/52\ SQ_s^2.$$

A soma correspondente ao resíduo é obtida por diferença. Êstes resultados estão contidos no quadro 4.

QUADRO 4.—Análise da variância (sem recuperação da informação entre-blocos), baseada nos ângulos correspondentes ao número de plantas sadias

Origem do êrro	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Blocos (não ajustados)	12	1490,56	-------	-------
Tratamentos (ajustados)	12	1512,36	126,03	-------
Resíduo	27	1267,56	46,95	2,68*
Total	51	4270,48	-------	-------

Os totais ajustados, correspondentes aos tratamentos, são obtidos a partir da fórmula a seguir, onde G corresponde ao total geral encontrado para o experimento.

$$T' = G/t + \frac{(t - 1)Q_s}{t(k - 1)} = 276,5 + 4/13\ Q_s.$$

A variância correspondente à produção total, ajustada, relativa a um tratamento, é de 46,95 x $4^2/13 = 57,78$.

Convém notar que êste tipo de análise da variância conduz a um teste exato das médias de tratamento.

3.1.2 - ANÁLISE COM RECUPERAÇÃO DA INFORMAÇÃO ENTRE-BLOCOS

Consideremos, agora, a análise da variância com recuperação da informação entre-blocos. Para seu cálculo, usamos, na análise, os tratamentos não ajustados, cuja soma de quadrados é obtida da maneira usual. A soma de quadrados correspondentes a blocos ajustados é obtida a partir dos valores W_s, onde $W_s = 9T_s - 12B_s + 3G$, os quais constam do quadro 5. Essa soma de quadrados é:

$$\frac{SW_s^2}{tr\ (t - k)\ (k - 1)} = \frac{SW_s^2}{1404} = 620,55.$$

QUADRO 5. — Cálculo de W_s e das produções corrigidas T''_s (com recuperação da informação entre-blocos), baseado nos ângulos correspondentes ao número de plantas sadias

Tratamento	W_s	T''_s	Tratamento	W_s	T''_s
0	207,3	217,7	7	341,7	251,8
1	317,4	298,5	8	— 108,3	286,5
2	— 55,5	278,3	9	— 111,3	289,5
3	— 206,4	263,8	10	— 487,8	333,4
4	171,9	271,0	11	— 217,8	297,2
5	— 325,8	268,9	12	177,0	283,3
6	297,6	251,0			

Os resultados obtidos para a análise da variância são os do quadro 6.

QUADRO 6. — Análise da variância (com recuperação da informação entre-blocos) baseada nos ângulos correspondentes ao número de plantas sadias

Origem do êrro	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Blocos (ajustados)	12	620,55	$E_b = 51,71$	
Tratamentos (não ajustados)	12	2382,37	198,53	4,23*
Resíduo	27	1267,56	$E_e = 46,95$	
Total	51			

Para obter os tratamentos ajustados, usamos o fator de ponderação

$$\mu = \frac{E_b - E_e}{t(k - 1)E_b},$$

onde E_b e E_e são os quadrados médios indicados no quadro 6 e, por conseguinte,

$$\mu = \frac{4{,}76}{39\,(51{,}71)} = 0{,}0024 \quad \text{e} \quad T''_s = T_s + \mu\, W_s.$$

A variância para o teste dos tratamentos T'' é dada por $E_e\,[1 + (t - - k)\,\mu] = 47{,}97$.

O teste de F relativo a tratamentos ajustados é, neste caso, uma prova aproximada.

3.2 - ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE TOMATES

Consideramos, agora, os resultados de produção de tomates, incluídos no quadro 7.

QUADRO 7. – Disposição dos tratamentos no campo e produção de tomates por parcela

Bloco	Tratamentos e produções respectivas								Produção total
	Trat.	Prod.	Trat.	Prod.	Trat.	Prod.	Trat.	Prod.	
		kg		kg		kg		kg	
1	0	62,5	1	64,8	3	58,6	9	41,2	227,1
2	11	77,6	1	65,1	7	34,4	12	59,1	236,2
3	11	62,9	6	53,0	10	45,0	0	53,6	214,5
4	3	54,6	2	56,9	5	53,6	11	53,4	218,5
5	10	56,5	8	50,7	3	51,8	7	39,6	198,6
6	2	51,9	0	36,4	12	48,7	8	34,0	171,0
7	10	42,9	2	36,6	1	42,8	4	31,5	153,8
8	5	30,7	0	22,4	7	32,4	4	27,1	112,6
9	5	46,3	10	38,9	12	44,2	9	41,5	170,9
10	2	51,3	9	28,7	7	28,1	6	28,2	136,3
11	8	15,7	9	44,4	11	50,4	4	54,6	165,1
12	6	22,3	12	55,7	4	56,2	3	51,3	185,5
13	6	47,9	1	57,5	5	51,7	8	44,5	201,6

As produções dos tratamentos 6 – bloco 12 e 8 – bloco 11, foram de 22,3 kg e 15,7 kg, respectivamente. Tais resultados, especialmente o último, destoam dos obtidos nas outras repetições. A discrepância é explicada pelo aparecimento de mancha onde houve ataque intenso de afídios. É razoável admitir que, no presente caso, a baixa produção obtida nos canteiros considerados tem uma causa determinada e assim podemos considerar independente do efeito dos inseticidas empregados, razão pela qual resolvemos substituir êsses resultados por produções calculadas.

A solução que torna mínimo o êrro entre-bloco é a seguinte (**1**):

$$x = \frac{tr(k-1)\;B_s + k(t-1)\;Q_\bullet - (t-1)\;Q'_\bullet}{(k-1)\;[(k-1) - k(t-1)]},$$

onde $Q'_\bullet$ é a soma dos valores Q_i; **i** indica os valores correspondentes a tratamentos outros que **s** e constantes do bloco que contém a produção procurada.

No presente caso necessitamos calcular dois valores : x que é a produção do tratamento 8, bloco 11, e y produção do tratamento 6, bloco 12.

Quadro 8. -Valores de T_s e B_s e produções corrigidas T'_s (sem recuperação da informação entre-blocos). Produções totais em quilogramas

Tratamento	T_s	B_s	T'_s	T''_s
0	174,9	725,2	179,1	178,2
1	230,2	818,7	218,4	220,9
2	196,7	679,6	220,0	215,1
3	216,3	807,4 + y	192,1	197,1
4	169,4	579,0 + x + y	193,6	188,5
5	182,3	703,6	194,9	192,3
6	129,1 + y	715,6 + y	163,8	165,2
7	134,5	683,7	142,2	140,6
8	129,2 + x	720,6 + x	157,4	159,0
9	155,8	683,7 + x	157,3	157,0
10	183,3	737,8	185,6	185,1
11	244,3	818,6 + x	224,7	228,8
12	207,7	741,3 + y	201,8	203,1

A partir dos resultados do quadro 8, atribuindo a y um valor provisório 129,1 / 3 = 43,0, calculamos :

$$x = \frac{13\ B_s + 4\ Q_s - Q'_s}{27} =$$

$$= \frac{13\ (149,4) + 4[4(129,2) - 720,6]}{27}$$

$$= \frac{4(169,4 + 155,8 + 244,3) - (622 + 683,7 + 818,6)}{27} = 36,0.$$

Usando êste valor de x, obtemos y, por processo idêntico ao indicado : $y = 1114,9/27 = 41,3$.

Utilizando, agora, êste valor de y, recalculamos x. Obtemos o valor $x' = 970,0/27 = 35,9$.

Se, agora, dermos a x êste último valor e recalcularmos y, obteremos $y' = 41,3$, que é o mesmo resultado já encontrado. Desta forma podemos terminar aqui êste processo de iteração. Os valores obtidos são agora utilizados no cálculo da análise da variância. Em primeiro lugar, será considerada a análise sem recuperação da informação entre-blocos.

As produções corrigidas, quando não usamos a informação entre-blocos (valores T') e quando a utilizamos (valores T''), foram incluídas no quadro 8. Podemos verificar que na maioria dos casos essas produções corrigidas pouco diferem das obtidas no experimento.

Na análise da variância (quadro 9), devido à utilização de duas produções teóricas, perdemos dois graus de liberdade, correspondentes à soma residual de quadrados.

QUADRO 9.—Análise da variância (sem recuperação da informação entre-bloco). Produção por parcela em quilogramas

Origem do êrro	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Tratamentos (ajustados)	12	1668,92	139,08	2,83*
Blocos (não ajustados)	12	4039,33	336,61	6,84*
Resíduo	25	1230,64	49,23	
Total	49	6938,89		

A variância residual efetiva, a ser usada na comparação de tratamentos, é $4^2/13$ (49,23) = 60,59.

Com a recuperação da informação entre-blocos, obtemos para essa variância o valor de 58,22 (quadro 10).

QUADRO 10. —Análise da variância (com recuperação da informação entre-blocos). Produção por parcela em quilogramas

Origem do êrro	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Tratamentos (não ajustados)	12	2876,85	239,74	4,87*
Blocos (ajustados)	12	2831,39	E_b = 235,95	4,79*
Resíduo	25	1230,65	E_e = 49,23	
Total	49	6938,89		

4 - SUMÁRIO E CONCLUSÕES

A análise da variância com recuperação da informação entre-blocos é indicada nos ensaios com um número de tratamentos relativamente grande. No caso em aprêço êsse número foi de 13 e obtivemos as seguintes variâncias residuais, em ângulo correspondente ao número de plantas sadias : 57,78 sem recuperação da informação entre-blocos e 47,97 com recuperação da informação entre-blocos. A redução obtida com a recuperação da informação entre-blocos foi de 16,92%. Para a produção de tomates, obtivemos 60,59, na análise sem recuperação da informação entre-blocos e 58,22, na com recuperação da informação entre-blocos.

A redução obtida com a recuperação da informação entre-blocos foi de 3,91%.

De acôrdo com êsses resultados, sòmente para o caso do número de plantas é que se mostrou realmente vantajoso o emprêgo do segundo processo da análise.

Representamos, na figura 1, os resultados obtidos nas análises anteriores. Os gráficos se referem a totais de tratamentos depois de ajustados, fazendo-se uso da informação entre-blocos. O gráfico superior se refere ao

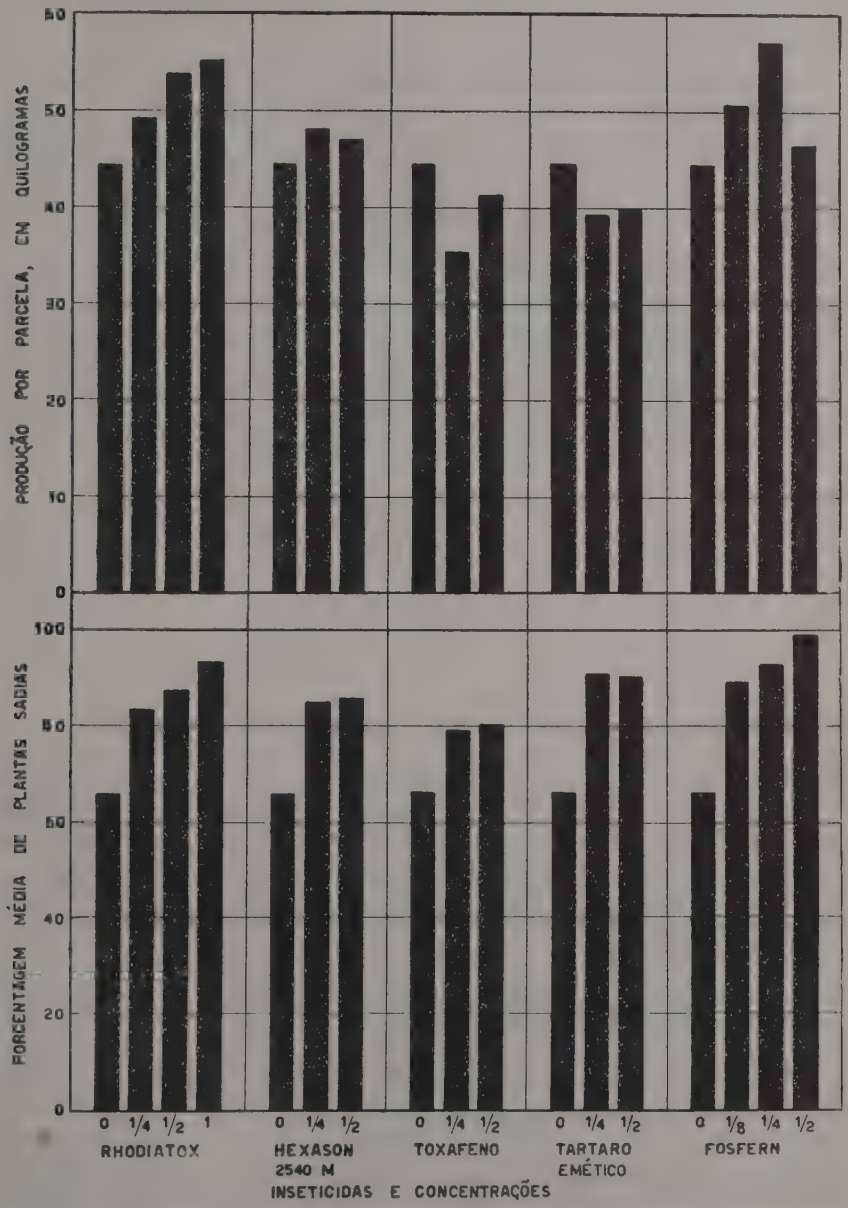


FIGURA 1.—Influência de vários inseticidas comerciais, em diferentes concentrações, no contrôle do vira-cabeça do tomateiro. Resultados relativos à produção e à percentagem de plantas sadias.

ângulo correspondente ao número de plantas sadias, e o inferior à produção de tomates em quilogramas.

Êstes últimos resultados permitem concluir que, de maneira geral, o contrôle obtido é proporcional às concentrações dos inseticidas empregados e também que êsses inseticidas, em suas concentrações altas, afetam o desenvolvimento das plantas, fatos já notados nas experiências anteriores. Assim, nas condições em que foi realizada esta experiência, isto é, em ocasião em que o ataque de vira-cabeça foi relativamente moderado, os tratamentos podem ser considerados como pertencendo a dois grupos : 1.º, aquêles que agiram favoràvelmente, isto é, em que ao ganho em plantas sadias correspondeu um aumento de produção em relação à média — Rhodiatox, Hexason e Fosfern ; e 2.º, aquêles em que, apesar de ter havido um aumento significante no número de plantas sadias, não houve um aumento correspondente da produção — Tártaro emético e Toxafeno.

É possível verificar essas conclusões a partir dos resultados apresentados no quadro 11.

QUADRO 11. Decomposição da soma de quadrados correspondentes aos tratamentos. (Totais ajustados, sem recuperação da informação entre-blocos.)

Decomposição	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F
ÂNGULOS CORRESPONDENTES AO NÚMERO DE PLANTAS SADIAS				
Decomposição *a*	788,18	1	788,18	13,64**
Dentro de *a*	1074,47	11	97,68	1,69
Decomposição *b*	97,00	1	97,00	1,68
Dentro de *b* — 1.ª parte	815,92	7	116,56	2,02
Dentro de *b* — 2.ª parte	161,56	3	53,85	0,93
				$V_e = 57,78$
PRODUÇÃO DE TOMATES EM QUILOGRAMAS				
Decomposição *a*	16,86	1	16,86	0,28
Dentro de *a*	2036,93	11	185,18	3,06**
Decomposição *b*	1581,94	1	1581,94	26,10**
Dentro de *b* — 1.ª parte	391,92	7	55,99	0,92
Dentro de *b* — 2.ª parte	63,05	3	21,02	0,35
				$V_e = 60,59$

As decomposições usadas foram as seguintes:

Decomposição *a*: Comparação da testemunha com os tratamentos empregados.
Dentro de *a*: Comparação dos tratamentos excluindo a testemunha.
Decomposição *b*: Tratamentos com Rhodiatox, Hexason 2540 M e Fosfern (1.º grupo) comparados aos tratamentos com Toxafeno e Tártaro emético (2.º grupo).
Dentro de *b*, 1.ª parte: Comparação entre os tratamentos do primeiro grupo.
Dentro de *b*, 2.ª parte: Comparação entre os tratamentos do segundo grupo.

Os tratamentos incluídos no primeiro grupo (Rhodiatox e Fosfern) correspondem a inseticidas preparados com um mesmo princípio ativo, e é desnecessário um teste para verificar que, para as mesmas concentrações dêsse princípio (o tiofosfato de dietil paranitrofenila), êles podem ser considerados como equivalentes. Não é possível afirmar que, quanto a seu comportamento, dêles difere o Hexason 2540 M.

Limitando-nos aos dois primeiros inseticidas, e deixando de lado sua marca comercial, para considerá-los ùnicamente em função do princípio ativo empregado, podemos estudar êsses tratamentos como segue:

Concentração em tiofosfato de dietil paranitrofenila	*Tratamento*
Testemunha	0
1 : 80.000	3
1 : 40.000	2 e 12
1 : 20.000	1 e 11
1 : 10.000	10

Êstes resultados esclarecem que, para maior concentração utilizada, êsse inseticida é prejudicial e que, no caso de o veículo utilizado nos dois preparados não diferir de maneira essencial, o dano causado deve ser atribuído exclusivamente ao princípio ativo.

A regressão linear, entre os pontos fornecidos pelos tratamentos considerados, não elimina pràticamente variação alguma, enquanto que é altamente significativa a redução devida à regressão quadrática (quadro 12)

Quadro 12.—Prova de significância de afastamento da regressão linear. Produção total de tomates, por tratamento, em quilogramas (produções ajustadas com recuperação entre-blocos)

Origem de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	F
Total	6	2095,12		
Regressão linear	1	18,93		
Resto (1)	5	2076,17		
Regressão quadrática	1	1928,06	1928,09	52,07**
Resto (2)	4	148,11	37,03	

SUMMARY

A detailed statistical analysis of a balanced, incomplete block experiment with insecticides to control tomato spotted wilt is given. The effect of the treatments was studied in relation to stand an yield. The angular transformation was used for stand, and the analysis of stand and yield was made with and without the inter-block information.

The results indicated that all insecticides tested, viz. Rhodiatox, Fosfern, Hexason 2540 M, Toxaphene, and tartar emetic reduced the number of plants killed by spotted wilt. The higher the concentration of the insecticides the better was the gain in stand. Some insecticides had a detrimental effect on the plant at high concentrations.

In relation to yield the treatments could be placed in two groups : a) a group in which demage caused by the treatment was greater than the benefit resulting from a better stand with no gain in yield ; b) a group in which there was also a gain in yield.

LITERATURA CITADA

1. **Cochran, W. G.** e **Cox, G. M.** *Em* The experimental designs. pág. 322-324. 1.ª edição, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1950.

2. **Costa, A. S., Forster, R.** e **Fraga Jr., C. G.** Contrôle de vira-cabeça do tomate pela destruição do vetor. Bragantia **10** : 1-9, fig. 1. 1950.

3. **Fisher, R. A. & Yates, F.** *Em* Statistical tables for biological, agricultural and medical research pág. 42, 1.ª edição. Oliver and Boyd, Londres, 1938.

4. **Mather, K.** *Em* Statistical analysis in biology, pág. 234-239, 2.ª edição, Interscience Publishers Inc. Nova Iorque, 1947.

NOTA

RACHADURA DOS TUBÉRCULOS DE BATATINHA. O.J. Boock e A.S. Costa. O aparecimento de tubérculos com rachaduras longitudinais bastante proeminentes (fig. 1) é comum em plantações de batatinha (*Solanum tuberosum* L.) feitas no Estado de São Paulo. As rachaduras já estão presentes nos

Figura 1.—Tubérculos de batatinha com o tipo de rachadura comumente observado em São Paulo.

tubérculos na ocasião da colheita, sendo menos comum o aparecimento após esta operação ; depreciam bastante o produto e têm sido observadas em tubérculos de diversas variedades colhidos em várias zonas do Estado e em tipos diferentes de solos.

No quadro 1 estão reproduzidas as percentagens de tubérculos com rachaduras encontradas em experiências de variedades realizadas em várias localidades. Vê-se, pelos dados, que a incidência da rachadura foi mais acentuada na cultura "da sêca", em que a chuva é mais abundante logo após a plantação, e tende a diminuir até a época da colheita. Mostraram-se mais suscetíveis à rachadura as variedades "Katahdin", "Green Mountain" e "White Bliss", de polpa branca, e "Z.P.C.-40 405", "Eersteling" e "Saskia",

QUADRO 1. — Percentagens médias de tubérculos rachados, em variedades de batatinha cultivadas em diversas zonas do Estado de São Paulo (1)

Variedade	Época de plantio e localidade									
	Cultura "da sêca" — fevereiro-junho							Cultura "das águas" setembro-fevereiro		
	Capão Bonito	Itapetininga	Louveira	Mococa	Taubaté	Tietê	Média geral	Campinas	Capão Bonito	Média geral
Alpha	5,0	----	5,0	10,0	0,0	----	5,0	----	6,0	6,0
Bintje	5,5	----	0,0	12,0	0,0	----	4,4	4,0	0,0	2,0
Doré	0,5	----	0,0	12,0	1,0	----	3,4	----	0,0	0,0
Eersteling	7,0	----	0,0	31,0	1,0	----	9,7	----	0,0	0,0
Eigenheimer	2,5	----	0,0	0,0	0,0	----	0,6	2,0	0,0	1,0
Green Mountain	8,0	20,0	9,0	18,0	1,0	26,0	10,3	----	----	----
Katahdin	18,0	42,0	50,0	13,0	6,0	8,0	22,8	----	----	----
Libertas	11,0	----	0,0	1,0	0,0	----	2,4	----	0,0	0,0
Neerlander	3,0	----	2,0	6,0	1,0	----	3,0	2,0	0,0	1,0
Saskia	2,0	----	2,0	27,0	3,0	----	8,7	----	2,0	2,0
Sneeuw & 56	8,0	----	0,0	12,0	0,0	----	5,0	0,0	0,0	0 0
Voran	2,0	----	0,0	9,0	0,0	----	2,7	----	4,0	4,0
White Bliss	5,0	9,0	18,0	12,0	3,0	0,0	9,4	----	----	----
Z. P. C. - 40 405	4,0	----	14,0	44,0	4,0	----	16,5	----	2,0	2,0

(1) As casas vagas significam que a variedade não foi incluída nas experiências

de polpa amarela. A maior incidência da rachadura dos tubérculos foi observada em Mococa (terreno argilo-silicoso), seguindo-se Capão Bonito.

Causas da rachadura : Rachaduras em tubérculos de batatinha já foram observadas em plantas atacadas pela moléstia de vírus *yellow dwarf* nos Estados Unidos (1), mas na maioria dos casos ela é de natureza fisiológica. Neste caso, a rachadura é explicada como devida à elevada pressão de turgescência nos tecidos dos tubérculos (2), (3), resultante de perda relativamente pequena de água por transpiração em plantas bem supridas de umidade. Qualquer causa que contribua para maior absorção de água pela planta ou para a redução na transpiração, tais como queda da temperatura, umidade elevada no ar, diminuição da área foliar, etc., poderá promover o aparecimento de rachaduras nos tubérculos. A pressão de turgescência nos tecidos chega a provocar a rachadura dos tubérculos ainda no solo, ou esta pode dar-se na ocasião da colheita, auxiliada por danos sofridos.

A observação em experiências de variedades durante muitos anos tem indicado que existe aparentemente uma correlação negativa entre suscetibilidade à rachadura e ao embonecamento. As variedades "Eigenheimer" e "Bintje", por exemplo, têm sido pouco sujeitas às rachaduras, mas embonecam bastante. Por outro lado, as variedades "Z.P.C.-40 405", "Eersteling" e "Katahdin" são bastante sujeitas às rachaduras, mas só excepcionalmente embonecam.

A fim de determinar se o tipo de rachadura da batatinha observado em São Paulo poderia ser de natureza patológica, procurou-se verificar se

(1) BLACK, L. M. A study of potato yellow dwarf in New York. Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir 209 : 1-23. 1937.

(2) JENSEN, J. H. e J. E. LIVINSTON. Potato diseases in Nebraska. Nebraska Agr. Exp. Sta. Bull. 378 : 1-47. 1945.

(3) WERNER, H. O. e J. O. DUTT. Reduction of cracking of late crop potatoes at harvest time by root cutting or vine killing. American Potato Journal 18 : 189-208, 1941.

esta condição era perpetuada pelos tubérculos afetados e se poderia ser transmitida por meio de enxertia para planta normal. Nos testes efetuados, verificou-se que a rachadura não é perpetuada pelos tubérculos. Também as enxertias com garfo proveniente de planta nascida de tubérculo com rachadura em plantas de tubérculos normais não ocasionaram o aparecimento da anomalia na produção destas. Secção de Raízes e Tubérculos e Secção de Genética, Instituto Agronômico de Campinas.

SUMMARY

In the State of São Paulo cracking of tubers is more prevalent in potato plantings made in the so-called "dry season planting" in which rainfall is more abundant in the beginning of the growing period of the plants and scarce toward the end.

Data from variety tests carried out in several localities indicated that Katahdin, Green Mountain, White Bliss, Z.P.C.-40,405, Eersteling, and Saskia showed high incidence of cracking. Eigenheimer showed little cracking.

A negative correlation between susceptibility to cracking and a tendency to form second growth has been noticed.

Negative results were obtained in attempts made to perpetuate the condition through the tubers. Transmission tests by grafting were also negative.

SECÇÕES TÉCNICAS

Secção de Agrogeologia : — J. E. de Paiva Neto, A. Küper, R. A. Cataní, F. C. Verdade, H. P. Medina, M. Gutmans, M. S. Queiroz, A. C. Nascimento, A. Klinck, M. T. Piza.

Secção de Botânica : — D. M. Dedecca.

Secção de Café : — J. E. T. Mendes, F. R. Pupo de Morais, H. J. Scaranari, Hélio de Morais.

Secção de Cana de Açúcar : — J. M. de Aguirre Júnior, J. B. Rodrigues, A. L. Segala.

Secção de Cereais e Leguminosas : — G. P. Viegas, N. A. Neme, J. Andrade Sobrinho, H. da Silva Miranda, M. Alcover, J. Gomes da Stlva.

Secção de Conservação do Solo : — J. Quintiliano de A. Marques, R. N. Tosello, F. Grohmann, J. Bertoni, F. M. Aires de Alencar, G. B. Barreto.

Secção de Entomologia : — Luiz O. T. Mendes, Romeu de Tola.

Secção de Fisiologia e Alimentação de Plantas : — C. M. Franco, Osvaldo Bacchi, R. Inforzato, H. C. Mendes.

Secção de Fitopatologia Aplicada : — A. P. Viegas, C. G. Teixeira.

Secção de Fumo, Plantas Inseticidas e Medicinais : — A. Rodrigues Lima, S. Ribeiro dos Santos, A. Jacob.

Secção de Oleaginosas : — O. Ferreira de Sousa, V. Canecchio Filho, E. Abramides.

Secção de Química Mineral : — J. B. C. Néri Sobrinho, A. de Sousa Gomide, F. L. Serafini, J. A. Neger, I. Mendes.

Secção de Raízes e Tubérculos : — J. Bierrenbach de Castro, Edgar S. Normanha (substituto), A. Pais de Camargo, O. J. Boock, A. S. Pereira.

Secção de Tecnologia Agrícola : — A. Frota de Sousa, M. B. Ferraz (substituto), J. P. Néri, A. de Arruda Veiga, E. Castanho de Andrade.

Secção de Técnica Experimental e Cálculo : — C. G. Fraga Júnior, A. Conagin.

ESTAÇÕES EXPERIMENTAIS

Central de Campinas : — R. Forster, Miguel A. Anderson, R. Munhoz.

Boracéia : —

Capão Bonito : — A. Rigitano.

Jaú : — M. Vieira de Morais.

Jundiaí : — J. S. Inglês de Sousa.

Limeira : — C. Roessing.

Mococa : — T. Ribeiro Rocha.

Monte Alegre do Sul : — A. Gentil Gomes.

Pindamonhangaba : — R. A. Rodrigues.

Pindorama : — J. Aloisi Sobrinho.

Piracicaba : — H. Correia de Arruda.

Ribeirão Prêto : — V. Lazzarini.

São Roque : — W. C. Ribas.

Tatuí : — D. M. Correia.

Tietê : — V. Gonçalves de Oliveira.

Ubatuba : — Natal de Assis Correia.

IMPRIMIU:
INDÚSTRIA GRÁFICA SIQUEIRA S/A
RUA AUGUSTA, 235 — SÃO PAULO
Enc. 6233 — 1951